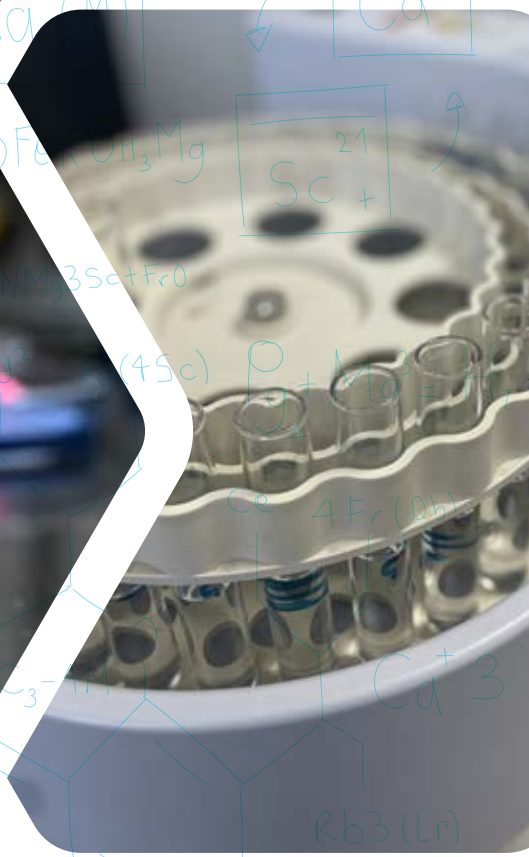
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA MUESTRAS AMBIENTALES









Ministerio de Ambiente

MARZO 2026
4ta EDICIÓN

AUTORIDADES

Prof. EDGARDO ORTUÑO SILVA
Ministro de Ambiente

Ing. Agr. OSCAR CAPUTI
Subsecretario del Ministerio de Ambiente

Ing. Quím. ALEJANDRO NARIO
Director Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental

Dra. ALEJANDRA VARELA
Directora General de Secretaría del Ministerio de Ambiente

RESPONSABLE TÉCNICO

Q.F. Natalia Barboza
Director División Laboratorio Ambiental de la Dirección Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental

ELABORACIÓN DE PROCEDIMIENTOS, REVISIÓN TÉCNICA

Q.F. Natalia Barboza
Ing. Quím. Carmela Capeci
Dra. Valentina Croce
Lic. Mariana Curto
Bach. Adriana Feo
Bach. Quím. Roxana Gálvez
Q.F. Cecilia Gentilini
T.Q. Ana Paula Giannechini
T.Q. Carolina Grau
Q.F. Alejandro Mangarelli
Bach. Mariana Martínez
Ing. Biot. Joaquín Martínez
Bach. Quím. Vivián Muñoz
T.Q. Hellen Navarlatz
MSc. Irene Pandulli
Q.F. Patricia Simone
Quím. Rodrigo Souza

RECOPILACIÓN Y EDICIÓN

Lic. Mariana Curto

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

División Comunicación Ministerial

ISBN formato papel: 978-9915-9790-3-8
ISBN formato electrónico: 978-9915-9790-4-5

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del Área Jurídica y de la División Comunicación Ministerial del Ministerio de Ambiente, cuyo aporte ha sido clave para la elaboración y difusión del presente Manual, contribuyendo a su accesibilidad y adecuada proyección institucional.

Asimismo, expresamos nuestro reconocimiento a los profesionales y técnicos del Ministerio de Ambiente que, desde diversos ámbitos de actuación, han acompañado y fortalecido las actividades del Laboratorio Ambiental. Su compromiso, experiencia y aportes técnicos constituyen un estímulo permanente para la consolidación y mejora continua de la División.

"Actúa como si lo que haces marcara una diferencia. Lo hace."

Ministerio de Ambiente

MINISTERIO DE AMBIENTE

Exp. 2026/002628
R.M. 290/2026

Montevideo, 24 MAR. 2026

VISTO: la necesidad de mantener actualizado el "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales" (Exp. 2026/36001/002628);

RESULTANDO: I) que por Resolución Ministerial N° 1648/017, de 26 de octubre de 2017, se aprobó el "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales" 3° edición, disponiéndose la obligatoriedad de los métodos y criterios técnicos contenidos en el mismo;

II) que, el Laboratorio realiza un trabajo permanente y constante en la actualización y elaboración de nuevos procedimientos analíticos para la realización de ensayos en diferentes matrices ambientales, atendiendo a la incorporación de nuevas tecnologías y a la actualización del marco normativo;

III) que, para consolidar esta actualización y ampliación de procedimientos analíticos, resulta necesario la publicación del nuevo Manual de Procedimientos Analíticos para Muestras Ambientales, en su cuarta edición, incluye un total de 109 (ciento nueve) procedimientos, de los cuales 35 (treinta y cinco) son nuevos y 74 (setenta y cuatro) actualizados para la determinación analítica de parámetros Fisicoquímicos generales, Orgánicos generales, Metálicos, Inorgánicos no metálicos, Microbiológicos, Ecotoxicológicos y Biológicos en matrices como agua, sedimentos, efluentes, residuos sólidos y peces;

CONSIDERANDO: I) que la Dirección Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental solicita la aprobación del "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales", 4° edición, dándole carácter obligatorio para el uso válido de los resultados analíticos en procedimientos y tramitaciones dentro de los cometidos de esa Secretaría de Estado;

II) que, como ediciones anteriores, el referido Manual se basa en métodos estandarizados de aceptación internacional, los que han sido adaptados teniendo en cuenta la experiencia del Laboratorio Ambiental y de sus profesionales, con

el apoyo del Programa de Modernización de la Institucionalidad para la Gestión y la Planificación Ambiental (Proyecto BID 3080/OC-UR);

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

ATENTO: a lo precedentemente expuesto y lo dispuesto por la Ley N° 17.283, de 28 de noviembre de 2000, por los artículos 291 y siguientes de la Ley N° 19.889, de 9 de julio de 2020, el artículo 514 de la Ley N° 19.924, de 18 de diciembre de 2020, Decreto N° 182/013, de 20 de junio de 2013, Decreto N° 135/021, 4 de mayo de 2021, y Decreto N° 226/025, de 20 de octubre de 2025;

EL MINISTRO DE AMBIENTE
RESUELVE:

1°. Apruébase el "Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales", 4° edición, elaborado por la División Laboratorio Ambiental, de la Dirección Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental, cuyos métodos y procedimientos técnicos resultarán obligatorios en toda presentación, intervención o requerimiento que incluya resultados analíticos.

2º. Cométese a la Dirección Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental la publicación del referido Manual y la instrumentación de mecanismos de difusión y capacitación en la materia.

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

4º. Déjase sin efecto la Resolución Ministerial N° 1648/017, de 26 de octubre de 2017, por la cual se aprobó la 3° edición del Manual.

5º. Publíquese la presente Resolución en el Diario Oficial (Sección Documentos) y vuelva a la Dirección Nacional de Calidad y Evaluación Ambiental para

Ministerio de Ambiente

su comunicación a las Áreas y Asesorías de la misma, a la Dirección Nacional de Aguas, a la Dirección Nacional de Servicios Ecosistémicos, y a la Dirección Nacional de Cambio Climático. Cumplido, siga a la División Laboratorio Ambiental y comuníquese a los laboratorios del Registro Nacional de Laboratorios Ambientales.

Ing. Agr. Oscar Caputi
Ministro (I) de Ambiente

CONTENIDO

Sección 1
Físicoquímicos Generales

21 SOP 1002UY Alcalinidad
29 SOP 1003UY Alcalinidad (titulador automático)
37 SOP 1005UY Color
43 SOP 1006UY Conductividad
49 SOP 1010UY Dureza total (titulador automático)
55 SOP 1011UY Dureza total
63 SOP 1012UY Dureza total (determinación por cálculo)
69 SOP 1016UY pH en suelo y sedimentos
75 SOP 1017UY pH
81 SOP 1018UY Silicatos
89 SOP 1019UY Sólidos sedimentables
95 SOP 1020UY Sólidos suspendidos (totales, fijos, volátiles)
103 SOP 1021UY Sólidos (totales, fijos, volátiles)
109 SOP 1022UY Turbidez
115 SOP 1023UY Sólidos disueltos
123 SOP 1025UY Potencial óxido-reductor
129 SOP 1050UY Humedad
135 SOP 1060UY CDOM
143 SOP 1073UY Material particulado en aire (PTS – PM 10)
151 SOP 1075UY Granulometría

Sección 2
Orgánicos Generales

159 SOP 2001UY Aceites y grasas
167 SOP 2002UY Hidrocarburos
175 SOP 2005UY Materia orgánica y carbono orgánico total
181 SOP 2007UY DBO5 Respirometría
193 SOP 2008UY DBO5
203 SOP 2009UY DQO
213 SOP 2010UY Detergentes aniónicos
221 SOP 2011UY DQO en bajas concentraciones
229 SOP 2012UY Detergentes aniónicos (kit de reactivos)

Sección 3
Metálicos

239 SOP 3123UY Aluminio
249 SOP 3127UY Bario
259 SOP 3128UY Cadmio
271 SOP 3129UY Calcio
281 SOP 3133UY Cinc
291 SOP 3134UY Cobre
301 SOP 3135UY Cromo Total
311 SOP 3138UY Hierro
321 SOP 3139UY Magnesio
331 SOP 3140UY Manganeso
341 SOP 3141UY Mercurio
351 SOP 3142UY Níquel
361 SOP 3145UY Plata
371 SOP 3146UY Plomo
381 SOP 3147UY Potasio
391 SOP 3149UY Sodio
401 SOP 3164UY Cromo VI
409 SOP 3190UY Metales por ICP-MS
421 SOP 3191UY Mercurio total en sedimentos (DMA)
429 SOP 3192UY Mercurio total en matrices líquidas (DMA)
437 SOP 3193UY Cationes
445 SOP 3236UY Digestión de líquidos en sistema cerrado (determinación metales)
453 SOP 3237UY Digestión en sistema abierto
459 SOP 3238UY Digestión de líquidos en sistema cerrado (determinación mercurio)
467 SOP 3260UY Metales en material particulado
475 SOP 3261UY Toxicidad de lixiviados
487 SOP 3262UY Digestión de sólidos en sistema cerrado
495 SOP 3276UY Determinación por adiciones estándar
501 SOP 3281UY Digestión de muestras sólidas para determinación de Cromo VI

Sección 4
Inorgánicos No Metálicos

511 SOP 4004UY Amonio (FIA)
519 SOP 4012UY Fósforo reactivo
527 SOP 4013UY Fósforo total
537 SOP 4014UY Fósforo total (FIA)
545 SOP 4017UY Fósforo total en matrices sólidas (FIA)
555 SOP 4018UY Fósforo reactivo (FIA)
563 SOP 4020UY Sulfato (FIA)
573 SOP 4029UY Aniones inorgánicos (Cromatografía Iónica)
581 SOP 4030UY Aniones inorgánicos (HPLC)
589 SOP 4051UY Sulfuro
597 SOP 4052UY Sulfuro (Titulación potenciométrica)
603 SOP 4077UY Fluoruro
611 SOP 4081UY Amonio (kit de reactivos)
619 SOP 4085UY Nitrato (FIA)
627 SOP 4086UY Nitrito
635 SOP 4087UY Nitrito (FIA)
643 SOP 4090UY NTK (FIA)
653 SOP 4091UY NTK en matrices sólidas (FIA)
663 SOP 4093UY Nitrato (kit de reactivos)
669 SOP 4094UY Nitrito (kit de reactivos)

Sección 5
Microbiológicos

677 SOP 5053UY Coliformes termotolerantes (filtración por membrana)
687 SOP 5054UY Coliformes totales (filtración por membrana)
697 SOP 5055UY Coliformes totales y Escherichia coli
705 SOP 5058UY Enterococos (filtración por membrana)
715 SOP 5065UY Coliformes termotolerantes (incubación tardía)
721 SOP 5070UY Verificación de enterococos
729 SOP 5071UY Verificación de coliformes totales
737 SOP 5072UY Verificación de coliformes termotolerantes
743 SOP 5079UY Enterococos (sustrato definido)
755 SOP 5080UY Enterococos (qPCR)
767 SOP 5081UY Salmonella (qPCR)
777 SOP 5082UY Extracción de ADN (kit de reactivos)

Sección 6
Ecotoxicológicos

787 SOP 6159UY Ecotoxicidad sistema Microtox
797 SOP 6161UY Ecotoxicidad Lemna
809 SOP 6163UY Ecotoxicidad Lactuca sativa
819 SOP 6201UY Preparación de muestras de residuos para ecotoxicidad

Sección 7
Biológicos

829 SOP 7003UY Ficocianina
837 SOP 7004UY Clorofila
845 SOP 7005UY Microcistinas totales (ELISA)
855 SOP 7006UY MC-LR (LC-UV)
865 SOP 7007UY Huevos de Helmintos
873 SOP 7008UY Cianotoxinas por ID (LC-MS/MS)
883 SOP 7009UY Cianotoxinas en aguas liofilizadas (LC-MS/MS)

Sección 8
Orgánicos

895 SOP 8084UY AOX
905 SOP 8089UY Plaguicidas en aguas naturales por ELL (GC-µECD)
919 SOP 8090UY Plaguicidas en matriz líquida por ID (LC-MS/MS)
933 SOP 8091UY Plaguicidas en peces (LC-MS/MS)
947 SOP 8092UY Plaguicidas en aguas naturales por SPE (LC-MS/MS)
961 SOP 8093UY Plaguicidas en sedimentos (LC-MS/MS)
973 SOP 8094UY Glifosato, AMPA y glufosinato de amonio en matrices líquidas por ID (LC-MS/MS)
983 SOP 8095UY Plaguicidas de alta polaridad en peces (LC-MS/MS)

ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

Medidas y Unidades

% – porcentaje

Abs – absorbancia

atm – atmósfera

CCE – células equivalentes del calibrador

cm – centímetro

fg – femtogramo

g – gramo

g/L – gramo por litro

g/mL – gramo por mililitro

h – hora

I_o – luminosidad a tiempo cero

kg – kilogramo

kPa – kilopascal

L – litro

L/min – litro por minuto

m – metro

M – molar

m^3/min – metro cúbico por minuto

mg/cm^2/30 días – miligramo por centímetro cuadrado cada treinta días

mg/L – miligramo por litro

min – minuto

mL – mililitro

mL/L – mililitro por litro

mM – milimolar

mm – milímetro

N – normal

ng – nanogramo

ng/µL – nanogramo por microlitro

nm – nanómetro

NTU – unidad nefelométrica de turbidez

p/p – peso en peso

pb – pares de bases

rpm – revoluciones por minuto

s – segundo

UA – unidad de absorbancia

UFC – unidad formadora de colonias

V – voltio

v/v – volumen en volumen

x g – fuerza centrífuga relativa

°C – grado Celsius

µg – microgramo

µg/µL – microgramo por microlitro

µg/kg – microgramo por kilogramo

µg/L – microgramo por litro

µg/m^3 – microgramo por metro cúbico

µL – microlitro

µm – micrómetro

µM – micromolar

µmho/cm – micromho por centímetro

µS/cm – microsiemens por centímetro

Reactivos

CLT – caldo lauril triptosa

CTAB – bromuro de cetiltrimetilamonio

dNTP – desoxinucleótidos trifosfato

EDTA – etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado

ISA – solución reguladora de fuerza iónica

LAS – sulfonato de alquilbenceno lineal

NET – negro de Eriocromo – T

OAS – solución de ajuste osmótico

ONPG – ortonitrofenil galactósido

PBS – tampón fosfato salino

TBE – tris-borato-EDTA

TSA – tripticasa soya agar

Parámetros y Metodologías

AOX – compuestos orgánicos halogenados adsorbibles

DBO – demanda bioquímica de oxígeno

DQO – demanda química de oxígeno

EAA – espectrofotometría de absorción atómica

ECD – detector de captura electrónica

ELL – extracción líquido-líquido

ESI – ionización por electrospray

FIA – análisis por inyección en flujo continuo

GC – cromatografía gaseosa

HPLC – cromatografía líquida de alta performance

IC – cromatografía iónica

ICP-MS – espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

LC-MS/MS – cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

MBAS – surfactantes aniónicos sensibles al azul de metileno

MS – espectrometría de masas

NMP – número más probable

NTK – nitrógeno total Kjeldahl

PCB – bifenilos policlorados

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

PM10 – partículas menores a 10 µm de diámetro

PTS – partículas totales suspendidas

qPCR – reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

QuEChERS – rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro

Otros

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADNasa – desoxirribonucleasa

ARN – ácido ribonucleico

ATCC – Colección Americana de Cultivos Tipo

BGC-D2 – corrección de fondo por lámpara de deuterio

CAS – número de registro del Chemical Abstracts Service

CO – citocromo oxidasa

Cq – ciclo de cuantificación

CV – coeficiente de variación

eLOD50 – límite de detección efectivo al 50 %

FD – factor de dilución

INE – instructivo de equipos

LC – límite de cuantificación

LD – límite de detección

LR – límite de reporte

NTC – control sin ADN molde

PA – grado para análisis

PGC – procedimiento para el control de calidad analítico

PR – procedimiento

PTFE – politetrafluoroetileno

PVDF – polifluoruro de vinilideno

RAD – registro administrativo

RCE – registro de control de equipo

RET – ruta de análisis de parámetro ecotoxicidad

RFQ – ruta de análisis de parámetro fisicoquímico

RGC – registro de gestión de calidad

RIG – registro de ingreso de muestras

RIN – ruta de análisis de parámetro de sector instrumental

RMB – ruta de análisis de parámetro microbiológico

RPR – registro de preparación de reactivos y estándares

RPS – registro de preparación de soluciones control

RSD – desviación estándar relativa

R^2 – coeficiente de determinación

SD – desviación estándar

UV – ultravioleta

PRÓLOGO

Los desafíos asociados al cambio climático, la gestión sostenible de los recursos naturales y la transición hacia modelos productivos más sostenibles exigen fortalecer las capacidades del Estado para producir conocimiento confiable, tomar decisiones fundadas y diseñar políticas públicas con visión de largo plazo. En este contexto, la generación de información ambiental de alta calidad se consolida como un pilar fundamental para la gestión pública ambiental, basada en evidencia científica, transparencia y responsabilidad pública.

Desde la publicación de la edición anterior, el país ha consolidado transformaciones relevantes que han redefinido el marco de la gestión ambiental y, en consecuencia, el papel de las capacidades analíticas como insumo crítico para la toma de decisiones públicas.

Entre los hitos más significativos se destaca la aprobación de la Ley de Gestión Integral de Residuos (N.º 19.829) en 2019, que estableció un cambio sustantivo en la concepción y abordaje de los residuos, incorporando principios de prevención, valorización y responsabilidad extendida. Posteriormente, en 2020, la creación del ***Ministerio de Ambiente*** *marcó un punto de inflexión en la jerarquización de la política ambiental, dotando al país de una institucionalidad específica y fortalecida. Este proceso se vio acompañado por la aprobación de instrumentos regulatorios de alta relevancia técnica, como el Decreto 135/21 – Reglamento de calidad de aire, y la Resolución Ministerial N° 916/2022, que aprobó el listado de metodologías de referencia para ensayos en emisiones de fuentes fijas, contribuyendo a la armonización y robustez del sistema de control ambiental.*

En el plano organizacional, la reestructura ministerial de 2023 consolidó el posicionamiento del laboratorio como división dependiente directo de la autoridad ambiental nacional, fortaleciendo simultáneamente su estructura interna mediante la creación de departamentos especializados. En el mismo período, la creación del Registro Nacional de Laboratorios Ambientales (RNLA), formalizada mediante la Resolución Ministerial 989/2023 bis, representó un avance estratégico en la gobernanza de la calidad analítica a nivel nacional. La entrada en vigencia de este instrumento reafirma la centralidad de la trazabilidad, la confiabilidad y la transparencia en la generación de información ambiental.

En paralelo, el marco normativo ambiental ha continuado su proceso de consolidación y actualización, incorporando instrumentos regulatorios y económicos orientados a fortalecer la gestión ambiental. En 2025, la Ley de Presupuesto Nacional introdujo disposiciones vinculadas a la internalización de costos ambientales, incluyendo mecanismos aplicables a plaguicidas de elevada peligrosidad ambiental. La eficacia de estos instrumentos depende, de manera directa, de la disponibilidad de información técnica confiable y de sistemas robustos de evaluación y control. En el mismo sentido, la aprobación del Decreto 226/2025 en materia de aguas actualiza el marco jurídico de calidad y protección de las aguas superficiales y subterráneas, estableciendo objetivos de calidad, límites de vertido y condiciones para actividades potencialmente contaminantes con un enfoque integral de gestión por cuencas y conservación del recurso, en línea con los avances de la ciencia, los desafíos del cambio climático y la sostenibilidad.

La formulación, la aplicación y la evaluación de políticas ambientales requieren información analítica confiable, trazable y técnicamente robusta. La calidad de los datos generados constituye una condición indispensable para la regulación, el control y la evaluación ambiental. En este marco, la División Laboratorio Ambiental cumple una función estratégica, al asegurar la solidez técnica y la credibilidad de la información que sustenta una acción pública eficaz, previsible y legítima.

Finalmente, corresponde destacar el compromiso y la excelencia técnica del equipo de la División Laboratorio Ambiental, cuya labor constituye el fundamento de las capacidades analíticas que este Manual sistematiza. Las metodologías aquí reunidas reflejan un proceso continuo de actualización, desarrollo y aseguramiento de la calidad, orientado a garantizar información ambiental confiable, trazable y útil para la gestión pública. Este trabajo sostenido reafirma la función estratégica del laboratorio como soporte esencial de la evaluación, el control y la política ambiental.

El presente Manual no solo constituye una herramienta técnica para la estandarización de metodologías analíticas, sino también una contribución significativa al fortalecimiento de la institucionalidad ambiental del país y a la consolidación de una política ambiental basada en evidencia, transparencia y responsabilidad pública.

Ing. Quím. Alejandro Nario
Dir. Nac. de Calidad y Evaluación Ambiental

Prof. Edgardo Ortuño
Ministro de Ambiente

INTRODUCCIÓN

La cuarta edición del Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales (2026) tiene la finalidad de establecer metodologías normalizadas, con criterios técnicos y requisitos mínimos de calidad para la generación de datos analíticos utilizados en la evaluación, control y gestión ambiental en el territorio nacional.

La estandarización de los métodos analíticos resulta esencial para asegurar la comparabilidad, trazabilidad y validez técnica de los resultados reportados por distintos laboratorios.

La producción de información ambiental confiable constituye un pilar fundamental para la toma de decisiones regulatorias, el otorgamiento de autorizaciones ambientales, el seguimiento de condiciones establecidas en permisos, la fiscalización de actividades potencialmente contaminantes y la protección de los recursos naturales y la salud pública.

Esta edición del manual, mantiene la estructura anterior, de ocho secciones de parámetros que agrupan un total de 109 procedimientos técnicos, de los cuales 35 corresponden a procedimientos nuevos.

Las ocho secciones son:

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

Los 109 procedimientos incluyen la determinación de parámetros en distintas matrices ambientales. Agua superficial y subterránea, efluentes líquidos, suelos, sedimentos, aire, residuos sólidos y peces son las matrices abarcadas en esta edición.

Cada procedimiento establece, como mínimo, el principio del método, alcance, interferencias, equipos, reactivos y materiales requeridos, control de calidad y cálculos. Además, estos están basados en normativas internacionales de referencia, tales como la Asociación Americana de Salud Pública – Métodos Estándares para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales (APHA); las normas de la Organización Internacional de Estandarización (ISO); los métodos de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA – USA); y documentos técnicos del Ministerio de Canadá.

Al igual que en la edición anterior, los procedimientos incluidos en este manual corresponden a los utilizados por el Laboratorio Ambiental de DINACEA en los ensayos de rutina para satisfacer la demanda analítica de la institución. Por este motivo, pueden encontrarse referencias a equipamiento, documentos internos o formatos de registro propios, los cuales deberán ser adaptados por cada laboratorio previo a su utilización. El uso de marcas comerciales es únicamente a título informativo y con fines de identificación, sin implicar exclusividad ni recomendación de uso.

Los laboratorios deberán implementar y mantener sistemas de gestión de calidad que aseguren la competencia técnica del personal, la calibración y mantenimiento adecuados del equipamiento, la trazabilidad metrológica de las mediciones y la documentación de los procesos analíticos. Se promueve la acreditación bajo la norma ISO/IEC 17025, siguiendo las pautas establecidas en el Registro Nacional de Laboratorios Ambientales (RNLA) mediante RM 989/2023 bis.

La correcta aplicación de este Manual contribuirá a fortalecer la calidad de la información ambiental generada en Uruguay, consolidar la confianza en los datos reportados y asegurar una gestión ambiental basada en evidencia técnica robusta y verificable.

Este proceso fue posible gracias a la dedicación, la experiencia y el compromiso del equipo de trabajo actual, así como de quienes formaron parte del laboratorio en etapas anteriores, cuyo aporte ha sido fundamental para asegurar la calidad y precisión de cada uno de los procedimientos evaluados.

Invitamos a profesionales y técnicos vinculados a las temáticas abordadas a remitir sus comentarios o consultas, con el fin de fortalecer la comunicación y promover el trabajo coordinado entre las instituciones públicas y privadas. Para ello, el laboratorio dispone del correo electrónico: laboratorio@ambiente.gub.uy.

Finalmente, recordamos que, además de su versión impresa, el contenido de este manual se encuentra disponible en la página web del Ministerio de Ambiente: www.gub.uy/ministerio-ambiente/.

Q.F. Natalia Barboza
Directora División
Laboratorio Ambiental
DNACEA - Ministerio de Ambiente

SECCIÓN 1
Fisicoquímicos Generales

1002UY

Determinación de alcalinidad en aguas naturales, superficiales y subterráneas

Método titulométrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 94).

2.6. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 98).

2.7. Ruta de análisis (RFQ 02).

2.8. Planilla de cálculo electrónica.

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La alcalinidad de un agua es su capacidad para neutralizar un ácido. La alcalinidad de aguas naturales, residuales y residuales tratadas se debe principalmente a los aniones bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos. Los valores medidos incluyen también la contribución de los iones boratos, fosfatos, silicatos y otras bases que puedan estar presentes.

3.2. La alcalinidad en el punto de pH 8,3 es la correspondiente a los iones hidróxido más la mitad de la concentración de los iones carbonatos. Alcalinidad total es la atribuible a los iones hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos.

3.3. La alcalinidad se determina por titulación potenciométrica con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico. El punto de equivalencia del bicarbonato es a pH 8,3 y el del ácido carbónico a pH 4,5.

3.4. Si la muestra tiene un pH mayor de 8,3 debe realizarse el análisis correspondiente a la alcalinidad de los dos puntos anteriormente mencionados.

3.5. En caso de tener algún inconveniente con el electrodo de pH pueden utilizarse reactivos indicadores para determinar los puntos de equivalencia a pH 8,3 (fenolftaleína) y a pH 4,5 (verde de bromocresol).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes al preparar las soluciones 8.3 y 8.4.

4.2. Utilizar guantes para calor seco o pinzas cuando se manipulen objetos calientes, como puede ser en la preparación del reactivo 8.2.

4.3. Manipular con precaución y preferentemente en campana cuando se realicen las diluciones de ácidos concentrados, como puede ser en la preparación del reactivo 8.3.

5. INTERFERENCIAS

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

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 250 mL de muestra en recipiente de plástico (polietileno o equivalente) o botella de vidrio de borosilicato, sin cámara de aire. Mantener la muestra refrigerada ≤ 6 °C (>0 °C). Realizar la determinación dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador de Iones.

7.2. Electrodo de hidrógeno de vidrio que lea 0,05 unidades de pH. Si no tiene compensación automática de temperatura, titular a 25 °C + 5 °C. El mismo se detalla a continuación:

Electrodo Orión 8102BNUWP con su solución de relleno Orión 810007.

Solución de almacenamiento para electrodo Orión 810001.

7.3. Buretas 10,0 mL y 25,0 mL con apreciación de 0,05 mL.

7.4. Agitador magnético y barras agitadoras.

7.5. Erlenmeyer o vasos de Bohemia de 100 y 250 mL.

7.6. Balanza de resolución 0,01 g

7.7. Balanza analítica de resolución 0,0001 g

7.8. Estufa para secado a 250°C

7.9. Guantes para calor seco

7.10. Pinzas para colocación de material en estufa.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3 Nro. CAS 497-19-8) 0,05 N: secar 3 a 5 g de estándar primario Na_2CO_3 a 250 °C durante 4 horas y enfriar en desecador. Pesar 2,5 g ± 0,2 g con una precisión de 1 mg, transferir a matraz aforado de 1 L y enrasar con agua desionizada. Preparar en forma semanal.

8.3. Solución madre de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 0,1 N: disolver 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado en 1 L de agua desionizada.

8.4. Solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: diluir 5 veces la solución de ácido sulfúrico 0,1 N (preparada en 8.3.) con agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N (según 10.1).

8.5. Indicador de fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$ Nro. CAS 77-09-8) 5 g/L: disolver 0,5 g de fenolftaleína en 50 mL de etanol (CH_3CH_2OH Nro. CAS 64-17-5) al 95 % y añadir 50 mL de agua desionizada.

8.6. Indicador verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$ Nro. CAS 76-60-8): disolver 100 mg de sal sódica de verde de bromocresol en 100 mL de agua desionizada.

8.7. Soluciones comerciales buffers estándar de pH 4,00 ± 0,01, 7,00 ± 0,01 y 10,00 ± 0,02.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Valoración de la solución estándar de ácido sulfúrico 0,1 N: Preparar la solución ácida de normalidad aproximada. Estandarizar contra 40,00 mL de solución de Na_2CO_3 0,05 N adicionando alrededor de 60 mL de agua en un matraz Erlenmeyer titulando hasta pH aproximado de 5. El gasto se puede medir en bureta de 25,00 mL.

En forma alternativa, tomar 10,00 mL de solución de Na_2CO_3 0,05 N en un Erlenmeyer y adicionar 40 mL de agua desionizada. Titular con el ácido sulfúrico correspondiente en bureta de 10,00 mL hasta aproximadamente pH 5.

En ambos casos, retirar el electrodo, enjuagar dentro del mismo recipiente y llevar a ebullición la solución contenida en el Erlenmeyer, cubierto con un vidrio de reloj entre 3 y 5 minutos. Dejar que llegue a temperatura ambiente, y finalizar la titulación llegando a pH 4,5. Obtener concordancia de dos valoraciones.

10.2. Valoración de la solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: Seguir el procedimiento del punto anterior tomando 5,00 mL de Na_2CO_3 0,05 N llevando a 50 mL con agua desionizada. Valorar el ácido en bureta de 25,0 mL. La normalidad del ácido sulfúrico estándar es:

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

donde:

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

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

G corresponde a mL de ácido utilizados en su valoración

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

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

Nota 1: La toma de la muestra debe ser tal que el gasto generado esté entre el 20 % y el 90 % del volumen total de la bureta. Realizar la toma en peso en balanza de precisión 0,01 g. Si el volumen de muestra no alcanza para que el electrodo quede sumergido completar con agua desionizada. En este caso, realizar un blanco de agua desionizada.

Titulación potenciométrica:

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

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

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

Nota 2: Para muestras de alcalinidad menor a 20 mg $CaCO_3$/L valorar con el ácido sulfúrico 0,02 N hasta pH 4,5 registrar el gasto de ácido a ese pH y continuar la valoración hasta pH 4,2 y registrar también este gasto de ácido.

Titulación con reactivos indicadores:

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

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

Nota 3: Valores de alcalinidad menores a 20 mg $CaCO_3$/L no pueden ser determinados por titulación con reactivo indicador.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Si la alcalinidad es mayor a 20 mg $CaCO_3$/L:

$$\text{Alcalinidad, mg } CaCO_3/L = \frac{G \times N \times 50000}{T}$$

donde:

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

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

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

12.2. Si la alcalinidad es menor a 20 mg $CaCO_3$/ L:

$$\text{Alcalinidad, mg } CaCO_3/L = \frac{(2 \times G1 - G2) \times N \times 50000}{T}$$

donde:

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

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

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

T corresponde al mL de muestra valorada

Informar el pH del punto final como se indica: “Alcalinidad a pH = _____= _____ mg $CaCO_3$ /L”

Cálculo de relaciones de alcalinidad:

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

Tabla de relaciones de alcalinidad

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

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

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

1. La alcalinidad de carbonatos está presente cuando la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína es menor a la alcalinidad total.
2. La alcalinidad de hidróxidos está presente si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína es más de la mitad de la alcalinidad total.
3. Existe alcalinidad de bicarbonatos si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 o determinada por viraje de fenolftaleína es menor a la mitad de la alcalinidad total. Esta relación puede ser calculada por la tabla anteriormente expuesta. Seleccionar el menor valor de P o (T-P). Allí la alcalinidad de carbonatos es dos veces el menor valor. Cuando el menor valor es P, el balance (T-2P) es bicarbonato. Cuando el menor valor es (T-P), el balance (2P-T) es hidróxido. Todos los resultados son expresados como mg $CaCO_3$/L.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** analizar por duplicado una de cada 3 muestras, mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control, según los límites de aceptación establecidos en el gráfico de control de precisión. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de exactitud:** valorar una solución control de similar concentración que la usada para estandarizar el ácido por batch. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aaceptación establecidos en el gráfico de control para exactitud. Si el resultado obtenido esta fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 2320 a Introduction y 2320 B Titration Method pp. 111 a 114.

1003UY

Determinación de alcalinidad en aguas naturales, superficiales y subterráneas

Método titulométrico automatizado

Elaborado - C. Grau

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1 Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2 Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3 Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4 Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5 Ruta de análisis (RFQ 37).

2.6 Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 94).

2.7 Instructivo de uso de titulador automático (INE 119).

2.8 Planilla de cálculo electrónica.

2.9 Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1 La alcalinidad de un agua es su capacidad para neutralizar un ácido. La alcalinidad de aguas naturales se debe principalmente a los aniones bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos. Los valores medidos incluyen también la contribución de los iones boratos, fosfatos, silicatos y otras bases que puedan estar presentes.

3.2 La alcalinidad en el punto de pH 8,3 es la correspondiente a los iones hidróxido más la mitad de la concentración de los iones carbonatos. Alcalinidad total es la atribuible a los iones hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos.

3.3 La alcalinidad se determina por titulación potenciométrica con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico. El punto de equivalencia del bicarbonato es a pH 8,3 y el del ácido carbónico a pH 4,5.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes al preparar las soluciones 8.3 y 8.4.

4.2. Utilizar guantes para calor seco o pinzas cuando se manipulen objetos calientes, como puede ser en la preparación del reactivo 8.2.

4.3. Manipular con precaución y preferentemente en campana cuando se realicen las diluciones de ácidos concentrados, como puede ser en la preparación del reactivo 8.3.

5. INTERFERENCIAS

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

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 250 mL de muestra en recipiente de plástico (polietileno o equivalente) o botella de vidrio de borosilicato sin cámara de aire. Mantener la muestra refrigerada ≤ 6 °C (> 0 °C). Realizar la determinación dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Titulador automático (Metrohm 848 Titrino plus o similar).

7.2. Agitador magnético (Metrohm 801 o similar) y barras agitadoras.

7.3. Electrodo de hidrógeno de vidrio (Metrohm Pt 1000/B/2/3M KCl o similar). Si el electrodo no tiene compensación automática de temperatura, titular a 25 °C ± 5 °C.

7.4. Erlenmeyer o vasos de Bohemia de 100 y 250mL.

7.5. Matraces aforados de 500 y 1000mL.

7.6. Balanza de resolución 0,01 g

7.7. Balanza analítica de resolución 0,0001 g

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3 Nro. CAS 497-19-8) 0,05 N: secar 3 a 5 g de estándar primario Na_2CO_3 a 250 °C durante 4 horas y enfriar en desecador. Pesar 2,5 ± 0,2 g con una precisión de 1 mg, transferir a matraz aforado de 1 L y enrasar con agua desionizada. Preparar en forma semanal.

8.3. Solución estándar de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 0,1 N: disolver 2,8mL de ácido sulfúrico concentrado en 1 L de agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N

8.4. Solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N: diluir 5 veces el ácido sulfúrico 0,1 N con agua desionizada. Estandarizar con carbonato de sodio 0,05 N.

8.5. Soluciones comerciales buffers estándar de pH 4,00 ± 0,01, 7,00 ± 0,01 y 10,00 ± 0,02.

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

La normalidad del ácido sulfúrico estándar es:

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

Donde:

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

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

G: corresponde a mL de ácido utilizados en su valoración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

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

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Realizar una toma de muestra entre 50 y 100 mL en un vaso de Bohemia o Erlenmeyer de forma que el electrodo quede cubierto por la muestra. La toma debe ser realizada en peso en balanza de resolución 0,01 g.

11.2. Calibrar el electrodo con las soluciones buffers de pH 4,00, 7,00 y 10,00 según INE 119.

11.3. Sumergir el electrodo dentro de la muestra y titular con la solución estándar de ácido sulfúrico 0,02 N según INE 119.

11.4. Registrar los datos obtenidos en RFQ 37 luego de la determinación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Cálculo de la concentración:

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

$$\text{Alcalinidad, mg } CaCO_3/L = \frac{G \times N \times 50000}{T}$$

Donde:

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

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

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

12.2. **Cálculo de relaciones de alcalinidad:**

Si el pH es mayor a 8,3, se puede establecer la relación estequiométrica entre las tres principales formas de alcalinidad presentes, según la siguiente tabla:

Tabla de relaciones de alcalinidad.

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

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

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

1. La alcalinidad de carbonatos está presente cuando la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 es menor a la alcalinidad total.
2. La alcalinidad de hidróxidos está presente si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 es más de la mitad de la alcalinidad total.
3. Existe alcalinidad de bicarbonatos si la alcalinidad correspondiente a pH 8,3 es menor a la mitad de la alcalinidad total.

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

Nota 3: Cuando P=0 y solicitan Carbonatos y Bicarbonatos, agregar la siguiente observación: De acuerdo a pH inicial de la muestra no se encuentran presentes Carbonatos, correspondiendo el valor de Alcalinidad total a la concentración de Bicarbonatos.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** analizar por duplicado una de cada 3 muestras, mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el porcentaje de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control, según los límites de aceptación establecidos en el gráfico de control para precisión. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la exactitud:** analizar una solución control de concentración cercana a las muestras analizadas y otra a una concentración de 10 mg/L aproximadamente. Obtener los resultados de los porcentajes de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlos con los límites de aceptación establecidos en el gráfico de control para exactitud. Si el resultado obtenido está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Méthod 2320 A Introduction y 2320 B Titration Method pp 111 al 114.

1005UY

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

Método de comparación visual

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - P. Giannechini

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para la determinación de color verdadero en aguas naturales y en aquellos efluentes industriales cuya tonalidad sea comparable con la de la solución de hexacloroplatinato de potasio. El límite de cuantificación es de 10 unidades de color.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de Balanza (INE 94).

2.6. Instructivo de pH-metro (INE 98).

2.7. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.8. Ruta de análisis (RFQ 04).

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINACEA(ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El término color se utiliza para la descripción de color verdadero, o sea aquel en que la turbidez del agua ha sido removida. El término color aparente incluye no solamente color debido a sustancias en la solución, sino también a material en suspensión. El color aparente es determinado en la muestra original sin realizar filtración ni centrifugación.

3.2. El color en aguas superficiales y de fondo, resulta primariamente de la presencia de material orgánico natural, particularmente sustancias húmicas.

3.3. Se determina la intensidad del color amarillo-amarronado de la muestra en comparación visual con una curva estándar de cloroplatinato de potasio. El resultado se expresa en términos de Unidades de Color representando la intensidad producida por la curva.

3.4. En el presente método se toma como unidad de color aquella producida por una solución de 1 mg/L de platino en la forma ion cloroplatinato.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El color se determina por comparación visual de la muestra contra concentraciones conocidas de la solución patrón coloreada. Por lo tanto si la muestra es muy coloreada diluirla para realizar el análisis.

5.2. El valor de color del agua es extremadamente dependiente del valor de pH por lo tanto se debe informar el pH al cual se hizo la medida de color.

5.3. Una escasa turbidez puede hacer que el color aparente sea informado con un valor mayor que el color verdadero, por lo tanto la turbidez debe ser removida por filtración.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

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

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Tubos Nessler de 50mL de capacidad, de fondo chato, con tapón y soporte correspondiente.

7.2. pH- metro y electrodo de pH.

7.3. Soluciones estándares de pH conocidos necesarios para ajustar el instrumento.

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.5. Matraz aforado de 500 y 1000 mL.

7.6. Pipetas automáticas de volumen variable 1-10 mL

7.7. Lámpara para observación de color.

7.8. Filtros de membrana de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro de 22 o 47 mm de diámetro.

7.9. Erlenmeyer de 100 mL.

7.10. Equipo de filtración: bomba de vacío, kitasato para trampa de agua, recipiente recolector de filtrado, soporte de filtro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada o grado superior (según ES 01).

8.2. Cloroplatinato de potasio (K_2PtCl_6 Nro. CAS 16921-30-5) PA.

8.3. Cloruro de cobalto ($CoCl_2.6H_2O$ Nro. CAS 7391-13-1) PA.

8.4. Ácido clorhídrico concentrado (HCl conc. Nro. CAS 7647-01-0) PA.

8.5. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) PA.

8.6. Solución estándar stock de 500 unidades de color: disolver 1,246 g de cloroplatinato de potasio (equivalente a 500 mg de platino metálico) y 1,00 g de cristales de cloruro de cobalto en agua desionizada con 100 mL de HCl concentrado y diluir a 1000 mL con agua desionizada. Asimismo, se pueden emplear soluciones comerciales de esta concentración, las cuales pueden ser empleadas como estándar primario.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

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

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Permitir que las muestras alcancen temperatura ambiente.

11.2. Medir el pH de la muestra, si se encuentra fuera del rango 4 a 10, ajustar a pH de aproximadamente 7 y tomar nota del ajuste.

11.3. Lavar el filtro y el equipo de filtración pasando por lo menos 50 mL de agua. Filtrar 25 mL de muestra y descartar. Filtrar otros 50 mL y conservar para su análisis

11.4. Observar el color de la muestra, colocándola en un tubo Nessler hasta la marca de 50 mL. Compararla con los estándares. Mirar verticalmente hacia abajo, a través de los tubos teniendo por fondo una superficie blanca o especular, ubicada en un ángulo de tal forma que la luz proveniente de la lámpara refleje y atraviese la columna de líquido en la dirección en que se observa. Si hay turbidez presente y no se ha eliminado, informar el color como color aparente.

11.5. Si el color medido excede las 100 unidades, tomar en el tubo Nessler, una alícuota de la muestra, registrar el volumen tomado y completar a volumen con agua destilada o calidad superior hasta que el color final se encuentre dentro de la escala de estándares.

11.6. Si se desea determinar color aparente, no llevar adelante el punto 11.3.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

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

donde:

A: corresponde al color estimado de la muestra diluida.

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

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

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

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

Nota 1: Si la muestra no fue filtrada informar color aparente.

12.3. Informar el pH de la muestra.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

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

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association (APHA) (2023) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24th Edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. 2120 A Color Introduction y 2120 B Visual Comparison Method, pp 81 al 83.

1006UY

Determinación de conductividad en aguas y efluentes industriales

Método conductimétrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la medida de conductividad en aguas y efluentes industriales, a 25ºC sin dilución, expresada en milisiemens por centímetro (mS/cm).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de equipo (INE 100).

2.6. Ruta de análisis (RFQ 13).

2.7. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La conductividad es la capacidad que posee una solución acuosa de conducir la corriente eléctrica, dicha habilidad depende de la concentración total de iones, de la movilidad y valencia de los mismos, así como también de la temperatura a la que se realiza la medida.

3.2. El método consiste en la medida directa de la conductividad, utilizando una celda, previamente estandarizada con una solución de conductividad conocida.

3.3. El método no permite dilución, ni la posibilidad de fortificación de las muestras analizadas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica y guantes.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. El análisis puede ser realizado tanto en campo como en el laboratorio.

6.2. Recolectar 250 mL de la muestra en envase de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C). El análisis debe realizarse dentro de los 7 días de tomada la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Conductivímetro con corrección de temperatura. En forma alternativa, si el equipo no incluyera la corrección, se debe contar con un termómetro externo para corregir la conductividad por temperatura.

7.2. Celda de conductividad correspondiente, con constante K, dependiente del tipo de matriz líquida a analizar.

7.3. Vasos de Bohemia que permitan alojar la celda y la cantidad de solución adecuada a la celda que se esté empleando.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES01).

8.2. Solución estándar de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7) 0,0100 M:

Preparación: disolver 0,7456 g de KCl en agua desionizada y diluir a 1000 mL en matraz aforado a 25°C; mantener en atmósfera libre de CO_2.

Esta solución estándar de referencia tiene a 25°C, una conductividad de 1412 µS/cm. Preservar dicha solución en un frasco de vidrio de borosilicato.

Esta solución es satisfactoria cuando la celda tiene una constante entre 1 y 2 cm^{-1}. Para celdas con otras constantes utilizar soluciones de otras concentraciones según recomendación del fabricante.

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

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Previo a la medida, la muestra debe estar homogeneizada y a temperatura ambiente para la realización del análisis.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Estandarización de la celda

10.1. Proceder de acuerdo al instructivo del equipo.

10.2. Utilizar solución de referencia comercial o preparada por el laboratorio.

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

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

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

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

11.3. Enjuagar la celda como en 10.3, y secar antes de analizar la próxima muestra.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

12.2. Para instrumentos con compensación automática de temperatura a 25ºC y lectura directa en mS/cm o µS/cm según corresponda, dejar registro en la ruta RFQ13.

12.3. Al momento de reportar el valor obtenido, verificar que el mismo se encuentre dentro de los valores aceptados por la celda según la constante de la misma. Si la celda no es correcta, se debe volver a realizar la determinación con una celda de constante adecuada para la medida.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Control de precisión: Realizar un duplicado cada 3 muestras analizadas o por lo menos un duplicado por batch.

Los límites de aceptación serán de 10% hasta contar con el gráfico de control correspondiente.

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

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Conductivity 2510 A Introduction, B Conductivity Laboratory Method. pp. 131 a 135.

1010UY

Determinación de Dureza Total en aguas naturales y aguas de pozo

Método titulométrico automatizado

Elaborado - C. Grau

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de dureza total en aguas naturales y aguas de pozos, con un límite de cuantificación de 10 mg $CaCO_3$/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 94 e INE 115).

2.6. Instructivo de uso de titulador automático (INE 119).

2.7. Ruta de análisis (RFQ 50).

2.8. Instructivo de uso del destilador y desionizador de agua (INE 82, INE 109 e INE 121).

2.9. Preparación de Solución de carbonato de calcio de Dureza total (RPR 22).

2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La dureza total se define como la suma de concentración de iones calcio y magnesio, expresados como carbonato de calcio ($CaCO_3$), en mg/L.

3.2. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales de sodio forman un complejo de quelato soluble al añadirlo a las soluciones de algunos cationes metálicos. Cuando se añade EDTA a la muestra que contiene calcio y magnesio, este se combina primero con el calcio y luego con el magnesio en medio básico (pH= 10) mediante el uso de una solución tampón.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

4.2. Máscara con filtro para solventes orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/organic vapor cartridge o similar).

5. INTERFERENCIAS

5.1. La materia orgánica suspendida o coloidal puede interferir con el punto final de la determinación. Se debe eliminar esta interferencia evaporando la muestra en un baño de vapor y luego calentar en mufla a 550 °C hasta oxidar por completo la materia orgánica. Disolver el residuo en 20 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N, neutralizar a pH= 7 con hidróxido de sodio (NaOH) 1N y llevarlo a 50 mL con agua destilada, enfriar a temperatura ambiente y continuar de acuerdo al procedimiento general.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 200mL de muestra en recipientes de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Preservar con ácido sulfúrico (H_2SO_4) o ácido nítrico (HNO_3) a pH<2 y refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). La muestra es estable durante 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Titulador automático (Metrohm 848 Titrino plus o similar).

7.2. Agitador magnético (Metrohm 801 o similar) y barras agitadoras.

7.3. Electrodo de Ca^{2+} (Metrohm 6.0510.100/1M NH_4NO_3 o similar).

7.4. Erlenmeyer o vasos de Bohemia de 100 y 250 mL.

7.5. Matraces aforados de 500 y 1000 mL.

7.6. Balanza de resolución 0,01 g

7.7. Balanza de resolución 0,0001 g

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ES 01).

8.2. Solución de HCl 5N: Disolver 41mL de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) en 100 mL de agua 8.1.

8.3. Solución de carbonato de calcio ($CaCO_3$ Nro. CAS 471-34-1) 0,1M: secar aproximadamente 5 g de estándar primario $CaCO_3$ a 140 °C durante toda la noche y enfriar en desecador por al menos 2 horas. Pesar 2,5 g con resolución 0,1 mg, transferir a matraz aforado de 250 mL. Agregar lentamente solución de ácido clorhídrico (HCl) 5N hasta que todo el carbonato de calcio se haya disuelto y enrasar con agua 8.1. Esta solución es estable durante 12 meses.

8.4. Solución buffer: disolver 5,4 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) y 35 mL de Hidróxido de amonio (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6) al 25% en 100 mL de agua 8.1.

8.5. Solución titulante de EDTA 0,05 M: disolver 18,615 g de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) en agua 8.1 y diluir a 1L. Estandarizar con la solución 8.2.

8.6. Control de dureza total (700 mg $CaCO_3$/L): pesar 0.700 g de carbonato de calcio ($CaCO_3$ Nro. CAS 471-34-1) y 0.2487 g de óxido de magnesio (MgO Nro. CAS 1309-48-4) previamente secados a 180°C durante una hora. Diluir con la mínima cantidad de HNO_3 1+1 posible y llevar a 1000 mL en matraz aforado con agua 8.1. Esta solución es estable durante 12 meses.

8.7. Solución de almacenamiento del electrodo ($CaCl_2$ 0,0.1M): Disolver 0.111 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$ Nro. CAS 10043-52-4) con agua 8.1 en matraz aforado de 100 mL.

8.8. Solución de relleno del electrodo (NH_4NO_3 1M): Disolver 8 g de nitrato de amonio (NH_4NO_3 Nro. CAS 6484-52-2) con agua 8.1 en matraz aforado de 100 mL.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Valoración de la solución titulante de EDTA 0,05 M: realizar una toma aproximada de 1,00 mL de $CaCO_3$ 0,1 M y llevar a 50,00 mL con agua 8.1. Realizar las tomas por peso en balanza con resolución 0,001 g. Registrar ambos datos en la ruta de análisis RFQ 50. Valorar la solución en el titulador automático según INE 119.

La molaridad del EDTA es:

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

donde:

C: corresponde a mol/L de la solución estándar de $CaCO_3$

T: corresponde a mL de solución de $CaCO_3$ tomados para la valoración de EDTA

G: corresponde a mL de EDTA utilizados en su valoración

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Realizar la titulación dentro de los cinco minutos luego de agregar la solución buffer.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Realizar una toma de muestra entre 50 y 100 mL en un vaso de Bohemia de forma que el electrodo quede cubierto por la muestra. La toma debe ser realizada en peso en balanza de resolución 0,001 g.

11.2. Sumergir el electrodo dentro de la muestra y titular con la solución de EDTA 0,05 M según INE 119.

11.3. Registrar el gasto obtenido en RFQ 50 luego de la determinación.

11.4. Registrar el gasto en el punto equivalente en el cual el voltaje se encuentre en el entorno de (-300 y -200) mV.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Se calcula la concentración de dureza total en la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Dureza total, mg } CaCO_3/L = \frac{G \times M \times 100000}{T}$$

donde:

G: corresponde al gasto de EDTA utilizado en la titulación.

M: corresponde a la molaridad de EDTA utilizado para la determinación.

T: corresponde a la toma (mL) de muestra valorada (asumiendo densidad 1 g/mL).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** analizar por duplicado una de cada tres muestras, mínimo una muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control, siendo 2.9% el máximo aceptado de dispersión hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la exactitud:** analizar dilución de la solución 8.6 de concentración cercana a las muestras analizadas y otra a una concentración de 10 mg/L aproximadamente. Obtener los resultados de los porcentajes de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlos con los límites de aceptación correspondientes, siendo 80 - 120 % el rango de aceptación hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Méthod 2340 A Introduction y 2340 C Titration Method pp 123 a 126.

14.2. Metrohm Application Bulletin 178/4 e, Fully automated water analysis.

14.3. Metrohm Application Bulletin 125/3 e, Simultaneous of calcium, magnesium, and alkalinity by Recomplexometric titration with potentiometric or photometric indication in water and beverage samples.

1011UY

Determinación de dureza total en aguas naturales y efluentes industriales líquidos

Método titulométrico con EDTA

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivos de uso de balanzas (INE15, INE 16).

2.6. Ruta de análisis (RFQ 08).

2.7. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La dureza total se define como la suma de concentración de iones calcio y magnesio, expresados como carbonato de calcio ($CaCO_3$), en mg/L.

3.2. Los iones calcio y magnesio forman complejos estables con etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA). El punto final de la titulación es detectado por el viraje de color del indicador “Negro de Eriocromo-T”, el cual presente un color rosado en presencia de calcio y magnesio en forma libre y un color azul cuando los cationes están formando complejos con EDTA.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

4.2. Máscara con filtro para solventes orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/organic vapor cartridge o similar).

5. INTERFERENCIAS

5.1. Algunos iones de metales pueden causar desvanecimiento del color o producir diferentes puntos finales en la titulación o por consumición estequiométrica del EDTA. Reducir estas interferencias adicionando inhibidores antes de la titulación (Tabla 1). Si las concentraciones de los metales presentes son mayores, se debe determinar calcio y magnesio por un método que no utilice EDTA y se puede obtener la dureza por cálculo.

5.2. La materia orgánica suspendida o coloidal puede interferir también con el punto final de la determinación. Se debe eliminar esta interferencia evaporando la muestra en un baño de vapor y luego calentar en mufla a 550 °C hasta oxidar por completo la materia orgánica. Disolver el residuo en 20 mL de ácido clorhídrico 1 N (HCl), neutralizar a pH 7 con hidróxido de sodio 1 N (NaOH), y continuar de acuerdo con el procedimiento general.

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

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

Nota: Tabla basada en porciones de muestras de 25 mL diluidas a 50 mL.

(*) Titulados como dureza

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

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

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

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

8. REACTIVOS

8.1. Solución buffer: disolver 1,179 g de etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado (EDTA $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) y 780 mg de sulfato de magnesio heptahidrato ($MgSO_4.7H_20$ Nro. CAS 10034-99-8) o 644 mg de cloruro de magnesio hexahidrato ($MgCl_2.6H_2O$ Nro. CAS 7791-18-6) en 50 mL de agua desionizada. Agregar a ésta solución 16,9 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) y 143 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6) concentrado. Mezclar y diluir a 250 mL con agua desionizada. Almacenar en botella de plástico, esta solución es estable un mes.

8.2. Indicador negro de eriocromo –T (NET): mezclar 0,5 g de NET con 100 g de cloruro de sodio (NaCl) y pulverizar en mortero.

8.3. Solución titulante de EDTA 0,01M: disolver 3,723 g de etilendiaminotetra-acetato disódico dihidratado (EDTA) en agua desionizada y diluir a 1000 mL. Guardar en botella de plástico. Titular contra solución patrón de calcio.

8.4. Solución patrón de calcio 1 g/L $CaCO_3$: pesar 1,000g de $CaCO_3$ anhidro seco en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Agregar lentamente solución de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 1+1 hasta que todo el carbonato de calcio se halla disuelto. Agregar 200 mL de agua desionizada y hervir 5 minutos para eliminar completamente el CO_2. Enfriar, agregar unas gotas de rojo de metilo y ajustar al color intermedio naranja agregando solución 3 N de NH_4OH o solución 1+1 de HCl según corresponda. Transferir cuantitativamente y enrasar a 1000 mL en matraz aforado con agua desionizada.

8.5. Inhibidor I: Ajustar las muestras ácidas a pH 6 o mayor con buffer o NaOH 0,1 N. Adicionar 250 mg de cianuro de sodio (NaCN Nro. CAS 143-33-9) en polvo. Adicionar suficiente buffer para ajustar el pH a 10,0 ± 0,1. Tener precauciones en el uso de cianuro de sodio por ser extremadamente tóxico.

8.6. Inhibidor II: Disolver sulfuro de sodio (5 g de $Na_2S.9H_2O$ Nro. CAS 1313-84-4 o 3,7 g de $Na_2S.5H_2O$) en 100 mL de agua desionizada. Este inhibidor se deteriora en contacto con el aire. Se produce un precipitado de sulfuro cuando altas concentraciones de metales pesados están presentes, oscureciendo el punto final. Emplear 1 mL en la titulación de la muestra.

8.7. Control de dureza total (700 mg $CaCO_3$/L): pesar 0.700 g de carbonato de calcio ($CaCO_3$ Nro. CAS 471-34-1) y 0.2487 g de óxido de magnesio (MgO Nro. CAS 1309-48-4) previamente secados a 180°C durante una hora. Diluir con la mínima cantidad de HNO_3 1+1 posible y llevar a 1000 mL en matraz aforado con agua 8.1. Esta solución es estable durante 12 meses.

8.8. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS1310-73-2) 0,1 N.

8.9. Agua desionizada (según ES01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Realizar la titulación dentro de los cinco minutos luego de agregar la solución buffer. Se debe descartar la solución buffer, si al adicionar a la muestra 1 o 2 mL de buffer, no se alcanza el pH deseado (pH 10,0 ± 0,1) en la muestra.

9.2. Para muestras con una dureza menor a 5 mg/L (aguas blandas o aguas naturales), se debe aumentar el volumen de muestra para la titulación (100 a 1000 mL), adicionar proporcionalmente a su vez, una mayor cantidad de inhibidor si fuera necesario, indicador y solución buffer. Se debe a su vez realizar un blanco, con el mismo volumen de muestra así como con las mismas cantidades adicionadas de inhibidor, indicador y solución buffer. Utilizar en este blanco el volumen de EDTA adicionado en la muestra.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

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

Nota 1: la toma de la solución de $CaCO_3$ debe realizarse con , pipeta automática de 10 ml verificada o en la balanza de precisión 0,01 g.

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

10.3. La normalidad del EDTA se determina según:

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

donde:

N: corresponde a mg de $CaCO_3$ equivalentes a 1000 mL de EDTA.

C: corresponde a mg/L $CaCO_3$ de la solución estándar de carbonato de calcio (8.4)

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

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

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas:

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

11.2. El pH especificado (10 ± 0,1) puede provocar precipitación de $CaCO_3$ a pesar de que el reactivo titulante disuelve lentamente este precipitado.

Métodos para reducir la precipitación:

1) Diluir la muestra con agua desionizada de forma de reducir la concertación de $CaCO_3$ si en una dilución 1+1 se produce precipitación utilizar 2) o 3).
2) Si se conoce la dureza o es determinada por una titilación preliminar, adicionar 90 % o más del reactivo titulante a la muestra antes de ajustar el pH con el buffer.
3) Acidificar la muestra y agitar con agitador magnético por 2 minutos de forma de eliminar el CO_2 antes de ajustar el pH. Determinar la alcalinidad para indicar la cantidad de ácido a adicionar.

Análisis de la muestra:

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

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

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

Nota 2: Si no se obtiene un punto final definido en cuanto a coloración, esto usualmente indica que debe adicionarse un inhibidor en este momento o que el reactivo indicador se ha deteriorado.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La Dureza Total se determina según:

$$\text{Dureza Total, mg } CaCO_3 = \frac{N \times G}{T}$$

donde:

N: corresponde a mg de $CaCO_3$ equivalentes a 1000 mL de EDTA.

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

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** analizar 10 mL de la solución control descripta en 8.7. Si quedase fuera de rango, diluir la solución de forma que la concentración del control se encuentre en los rangos de concentración de las muestras. Llevar adelante esta determinación de simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

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

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method Hardness Introduction 2340A and2340C Titration Method pp 123 a 126.

1012UY

Determinación de dureza total en aguas naturales y efluentes industriales líquidos

Cálculo de dureza a partir de valores de Ca y Mg

Elaborado - S. Andrade

Modificado - P. Simone

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de dureza total por cálculo en aguas naturales y efluentes industriales, a partir de las concentraciones de Calcio y Magnesio previamente obtenidas mediante análisis.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Determinación de Calcio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama." (3129UY).

2.6. Procedimiento: "Determinación de Magnesio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama. " (3139UY).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La dureza del agua es entendida como una medida de la capacidad del agua para precipitar jabón, siendo los iones calcio y magnesio los principales responsables. Manteniendo la práctica habitual, es que dureza se define como la suma de concentraciones de calcio y magnesio, ambas expresadas como carbonato, en mg/L. Los iones calcio y magnesio se determinan según las referencias 2.5 y 2.6 respectivamente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. No aplica.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. No aplica.

8. REACTIVOS

8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. No aplica.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

$$\text{Dureza Total, mg } CaCO_3 \text{ /L= 2,497 x [Ca mg/L] + 4,118 x [Mg mg/L]}$$

donde:

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

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

2,497 corresponde al factor de conversión de mg/L de Ca, a mg/L de $CaCO_3$.

4,118 corresponde al Factor de conversión de mg/L de Mg, a mg/L de $CaCO_3$.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 2340 A Introduction y B Hardness by calculation pp. 123.

1016UY

Determinación de pH en suelo y residuos

Método electrométrico

Elaborado - R. Gálvez

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Ruta de análisis (RFQ 26).
2.6. Instructivos de uso del analizador de iones (INE 98).
2.7. Instrucciones de uso de las balanzas (INE 16A,16B).
2.8. Instructivo de uso de estufas 104 °C (INE 101, INE 107).
2.9. Instrucciones de uso de plancha calefactora con agitación (INE 129).
2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica y guantes descartables.

5. INTERFERENCIAS

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

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en bolsa de polietileno con cierre hermético e impermeable. Muestra mínima 200 g; refrigerada ≤ 6 °C (>0 °C).
6.2. La muestra debe ser analizada lo antes posible (15 minutos).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Agitador magnético.
7.2. Pastillas magnéticas.
7.3. Analizador de iones.
7.4. Electrodo combinado para determinación de pH, o electrodo de pH y electrodo de referencia.
7.5. Termómetro con precisión a 1 °C o electrodo de pH con corrector de temperatura.
7.6. Baño de agua para operar a 25 °C ± 1 °C
7.7. Balanza de resolución 0,1 g.
7.8. Matraz de borosilicato de 250mL mínimo, que tengan tapa o la posibilidad de ser mantenidos cerrados.
7.9. Vaso de Bohemia de borosilicato o polipropileno de 50mL de capacidad.
7.10. Estufa para operar a 103 - 105 °C.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ES 01)

8.2. Soluciones buffer: Se puede utilizar soluciones comerciales de pH 4, 7 y 10. En forma alternativa, preparar las soluciones de acuerdo a lo siguiente:

-pH 4,00 a 20 °C	Disolver 10,21 g de ftalato acido de potasio ($C_8H_5KO_4$ Nro. CAS 877-24-7) en 1000mL de agua desionizada (8.1). Dicho sólido debe ser secado por 2 h a 115 °C ± 5 °C.
-pH 6,88 a 20 °C	Disolver 3,39 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0), y 3,53 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 Nro. CAS 7558-79-4) en agua desionizada (8.1), y diluir a 1000mL. El fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) debe ser secado por 2 h a 115 °C ± 5 °C.
-pH 9,22 a 20 °C	Disolver 3,80 g tetraborato de sodio decahidratado ($Na_2B_4O_7.10H_2O$ Nro. CAS 1303-96-4) en agua desionizada (8.1), y diluir a 1000mL; Dicho sólido, si es almacenado por mucho tiempo puede perder aguas de cristalización.

Nota 1: Fraccionar porciones de 20 mL aprox. de buffers en frascos de polietileno. Reemplazar las soluciones buffer periódicamente, o cuando la pendiente del analizador indique valores de calibración fuera del rango de aceptación, o se detecte que las soluciones presenten alteraciones en su aspecto (crecimiento microbiano y/o turbidez).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. En el caso que el pH determinado sea mayor a 10 unidades de pH, se deberá informar como estimado el valor obtenido, o de lo contrario contar con un electrodo específico para este tipo de medidas.

9.2. El secado del suelo puede influir en el valor de pH obtenido, principalmente en muestras que contengan sulfuros, el valor obtenido puede verse significativamente disminuido.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Ajuste del analizador de iones según instructivo correspondiente, utilizando por lo menos dos soluciones buffer.

Repetir el ajuste con una nueva fracción si el valor obtenido de la solución buffer se aparta en más de 0,05 unidades de pH de su valor nominal.

10.2. Se debe controlar la temperatura a 25 °C ± 1 °C, por lo que se recomienda la utilización de un baño para termostatizar las muestras y los buffers.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación y determinación de pH

11.1. Llevar la muestra a temperatura ambiente; homogeneizarla en una bolsa de polietileno previo a la realización de la toma.

11.2. Realizar una mezcla 1:5 de muestra y agua desionizada. Se ha observado desde el punto de vista experimental que la cantidad de masa más adecuada para trabajar es de 20 g.

11.3. Colocar 20g de muestra en un matraz de 250mL, agregar 100g de agua desionizada y agitar por 5 minutos. Para el caso de muestras higroscópicas, con sales o matrices problemáticas puede ser necesaria la realización de diluciones adicionales. (Nota 2)

11.4. Dejar reposar la suspensión por 1 hora en el caso de suelos y 15 minutos para residuos, dentro del baño termostatizado, para permitir que la mayoría de las partículas suspendidas decanten, trasvasar el sobrenadante a un vaso de Bohemia. Si es necesario, se puede filtrar o centrifugar la muestra para realizar la medición.

11.5. Mantener el sobrenadante dentro del baño termostatizado hasta el momento de realizar la medición.

11.6. La medición de pH se deber realizar en el sobrenadante para establecer un buen contacto con la solución obtenida, siendo el volumen mínimo necesario para poder hacer la determinación unos 20mL

Nota 2: Si el sobrenadante posee más de una fase, descartar la fase oleosa y realizar la medición en la fase acuosa, teniendo en consideración la limpieza adecuada del electrodo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control instrumental:** El porcentaje de slope obtenido debe ser mayor a 92 % y menor a 102%

13.2. **Control de la exactitud:** Luego de realizado el análisis verificar con una solución buffer comercial o preparada que el valor obtenido no se aparte más del 10 % de lo teórico.

13.3. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos normalizados correspondientes. (Según Manual de Control de Calidad Analítico).

13.4. **Control de repetibilidad:** Cada laboratorio debe verificar su propia repetibilidad interna a partir del análisis por duplicado y establecer sus criterios de aceptación en función del desempeño obtenido.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA Method 9045D – Soil and waste pH, November 2004, Revision 4.

14.2. ISO 10390:2021 Soil, treated biowaste and sludge – Determination of pH.

1017UY

Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos

Método potenciométrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).

2.6. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.7. Instrucciones de uso de plancha calefactora con agitación (INE 129).

2.8. Ruta de análisis (RFQ 29).

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El pH o la actividad del ion hidrógeno indica, a una temperatura dada, la intensidad de las características ácidas o básicas de una solución.

3.2. El pH se define como el logaritmo de la inversa de la actividad de los iones hidrógeno,

$$pH = - \log [H^+]$$

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

5. INTERFERENCIAS

5.1. El electrodo de vidrio generalmente no está sujeto a interferencias como color, turbidez, materia coloidal, oxidantes, reductores o alta salinidad, excepto para un “error de sodio”, que se da a pH mayores de 10. Este error se puede reducir usando un electrodo especial de bajo error de sodio.

5.2. La determinación de pH no puede ser llevada a cabo con exactitud en medios no acuosos, suspensiones, coloides o soluciones de alta fuerza iónica.

5.3. Recubrimientos de material graso o partículas pueden dificultar la respuesta del electrodo. Estos recubrimientos pueden ser removidos con una frotación muy suave con papel tissue o utilizando detergentes, seguido de un enjuague con agua destilada. Un tratamiento adicional es utilizar ácido clorhídrico (1 + 9) para remover cualquier película restante.

5.4. Las medidas de pH son afectadas por la temperatura en dos formas: por efectos mecánicos causados por cambios en las propiedades de los electrodos y por efectos químicos causados por cambios de equilibrios. En el primer caso las interferencias pueden ser controladas utilizando instrumentos que posean compensación de temperatura o calibrando el sistema electrodo-instrumento a la temperatura de las muestras. La segunda fuente de error depende de las muestras y no puede ser controlada, por lo cual se debe reportar la temperatura con cada medida de pH realizada.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. El análisis debería ser realizado en campo, de no ser posible y deba ser realizado en el laboratorio, la muestra debe ser tomada sin cámara de aire, llenando completamente el recipiente de muestreo. La cantidad de muestra típica es de 250 mL, en recipiente de vidrio o plástico (polietileno, teflón o equivalente). Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C).

6.2. El valor de pH determinado en el laboratorio se informará como valor estimado; ya que el tiempo recomendado para la determinación del parámetro son 15 minutos a partir del momento de tomada la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador de iones (VersaStar ó similar).

7.2. Electrodo combinado para determinación de pH, o electrodo de pH y electrodo de referencia (a modo de ejemplo: Electrodo Orion 8102BNUWP con su solución de relleno Orion 810007 y solución de almacenamiento Orion 910001, o Electrodo Orión 9156DJWP de doble unión con cuerpo epoxi y gel de relleno o similar.

7.3. Termómetro con precisión a 1 °C o electrodo de pH con corrector de temperatura

7.4. Agitador magnético y barras magnéticas de agitación.

7.5. Estufa para uso a temperatura de 115 °C ± 5 °C (en caso de preparación de soluciones buffers)

7.6. Vasos de Bohemia de 100 o 250 mL.

7.7. Papel tissue.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01)

8.2. Soluciones buffers estándar de pH conocido (pH 4, pH 7 y pH 10), necesarias para calibrar el instrumento. Se pueden emplear soluciones adquiridas en forma comercial (estandarizadas); de lo contrario soluciones preparadas según:

-pH 4,00 a 20 °C	Disolver 10,21 g de ftalato acido de potasio ($C_8H_5KO_4$ Nro. CAS 877-24-7) en 1000mL de agua desionizada (8.1). Dicho sólido debe ser secado por 2 h a 115 °C ± 5 °C.
-pH 6,88 a 20 °C	Disolver 3,39 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0), y 3,53 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 Nro. CAS 7558-79-4) en agua desionizada (8.1), y diluir a 1000mL. El fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) debe ser secado por 2 h a 115 °C ± 5 °C.
-pH 9,22 a 20 °C	Disolver 3,80 g tetraborato de sodio decahidratado ($Na_2B_4O_7.10H_2O$ Nro. CAS 1303-96-4) en agua desionizada (8.1), y diluir a 1000mL; Dicho sólido, si es almacenado por mucho tiempo puede perder aguas de cristalización.

Nota 1: Fraccionar porciones de 20 mL aprox. de buffers en frascos de polietileno. Reemplazar las soluciones buffer periódicamente, o cuando la pendiente del analizador indique valores de calibración fuera del rango de aceptación, o se detecte que las soluciones presenten alteraciones en su aspecto (crecimiento microbiano y/o turbidez).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Ajuste del analizador de iones según instructivo correspondiente, utilizando por lo menos dos soluciones buffer. Repetir el ajuste con una nueva fracción si el valor obtenido de la solución buffer se aparta en más de 0,05 unidades de pH de su valor nominal.

10.2. Se debe controlar la temperatura a 25 °C ± 1 °C, por lo que se recomienda la utilización de un baño para termostatizar las muestras y los buffers, en caso de utilizar un electrodo sin compensación de temperatura.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Permitir que la muestra llegue a temperatura ambiente y tomar un volumen suficiente para sumergir el electrodo (60 mL aprox). Colocar una pastilla magnética.

11.2. Sumergir el electrodo limpio y seco en la toma realizada anteriormente y comenzar la medición. La agitación debe ser moderada para impartir homogeneidad y minimizar la entrada de dióxido de carbono (CO_2), (la velocidad de agitación debe ser igual a la utilizada para la homogeneización de los buffers durante el ajuste).

11.3. En el caso de muestras con buffers o aquellas con alta fuerza iónica, sumergir el electrodo en la muestra por un minuto. Enjuagar y secar el electrodo. Sumergir en una nueva porción de muestra y luego realizar la lectura.

11.4. En caso de soluciones diluidas, pobremente tamponadas, el electrodo debe ser equilibrado sumergiéndolo en tres o cuatro porciones de muestra por unos minutos; y tomando una muestra nueva para la determinación.

11.5. Enjuagar el electrodo con agua (según ES 01) y secar antes de analizar la próxima muestra.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control instrumental:** El porcentaje de slope obtenido debe ser mayor a 92 % y menor que 102%.

13.2. **Control de la exactitud:** Luego de realizado el análisis verificar con una solución buffer comercial o preparada que el valor obtenido no se aparte más del 10 % de lo teórico.

13.3. **Control de precisión:** Cada 3 muestras de efluentes o cada 5 muestras de aguas, realizar la medición por duplicado e informar el promedio de ambos valores, contando al menos con un duplicado por corrida. Realizar gráfico de control de precisión según Manual de Control de Calidad Analítico (puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos normalizados).

Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control correspondientes.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 4500 A introduction y 4500 B Electrometric method - pp 473 al 478.

14.2. Manual de electrodo de pH, Orion.

14.3. ISO 10390:2021 Soil, treated biowaste and sludge – Determination of pH

1018UY

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

Método colorimétrico

Elaborado - F. Lauber

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinar la concentración de sílice soluble reactiva al molibdato para formar ácido silicomolíbdico en aguas naturales, en concentraciones entre 0,92 a 75 mg SiO_2/L. El límite de detección es de 0,18 mg SiO_2/L. También es aplicable a aguas salobres o salinas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16 A, INE 16 B).

2.6. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 145).

2.7. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02).

2.8. Instructivo de uso de desionizador (INE 121).

2.9. Instructivo de analizador para determinación de pH (INE 98).

2.10. Ruta de análisis (RFQ 14).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El molibdato de amonio; a pH 1,2 aproximadamente, reacciona con sílice y fosfatos presentes formando heteropoliácidos. El ácido oxálico es adicionado para destruir el ácido molibdofosfórico pero no el ácido silicomolíbdico. Aunque se conozca la ausencia de fosfatos, la adición del ácido oxálico es un paso necesario.

3.2. La intensidad del color amarillo formado es proporcional a la concentración de sílice reactiva al molibdato, como ácido silicomolíbdico, la cual se mide en un espectrofotómetro a 410 nm. La concentración se determina mediante una curva de calibración.

3.3. La sílice puede ser determinada como sílice total, sílice molibdo-reactiva, sílice disuelta y alguna dispersa coloidalmente. Este método detecta sílice molibdo-reactiva pero también es posible transformar otras formas de sílice en la forma molibdo-reactiva para su determinación como tal por medio de calentamiento o por medio de una fusión alcalina. Si se realiza este paso debe ser aclarado al informar el resultado.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. Trabajar en campana de extracción de gases para la preparación de ácido clorhídrico diluido.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interfieren en la medida: taninos, altas concentraciones de hierro, color, turbidez y sulfuros.

5.2. El tratamiento con ácido oxálico elimina la interferencia por fosfatos, y disminuye la interferencia con los taninos.

5.3. En muestras de agua salada, la intensidad del color amarillo producido por el método decrece entre un 20 y un 35% debido a las altas concentraciones de sal. Esto se debe a que la sal confiere al medio una mayor fuerza iónica y para la formación del ácido silicomolíbdico de color amarillo se requiere una fuerza iónica menor a 0,5. Cuando se desea medir muestras de agua salada, la calibración se lleva a cabo midiendo el aumento producido por una adición conocida de silicato a una muestra de agua de mar con contenido de silicio. Si dicha muestra no está disponible, se puede realizar una adición de 3,5% en peso/volumen de cloruro de sodio según lo citado en bibliografía.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 100mL de la muestra en recipientes de polietileno, polipropileno, u otro plástico. El vidrio de borosilicato es menos deseable, particularmente con aguas de pH superior a 8 o con agua de mar, en cuyo caso se puede disolver una cantidad significativa de sílice del vidrio. Mantenerla refrigerada a temperatura ≤6 °C (> 0 °C), como máximo 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro o colorímetro, con longitud de onda a 410nm, con paso de luz de 1 cm o mayor.
7.2. Celda: Tubos que permitan alojar 25mL y de 2,5 cm de diámetro con tapa.
7.3. Balanza de resolución de 0,01 g para preparación de reactivos.
7.4. Balanza de resolución de 0,001 g para toma de muestras y estándares
7.5. Pipeta automática de rango entre 100 –1000 µL, con tips correspondientes.
7.6. Pipeta automática de rango entre 1 y 10mL, con tips correspondientes.
7.7. Matraz aforado de 1000mL.
7.8. Tubos de 50mL de capacidad para la dilución del estándar
7.9. Vasos de Bohemia de 250mL.
7.10. Analizador de pH

8. REACTIVOS

Nota 1: Almacenar todos los reactivos en frascos de plástico dado que el vidrio puede causar interferencia de acuerdo al pH que presente la solución.

8.1. Agua desionizada (según ES 01).
8.2. Solución de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 N:

Pesar 4 g de NaOH y llevar a volumen (100mL) con agua desionizada.

8.3. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 1 + 1:

Diluir en vaso de bohemia 100mL de HCl concentrado en 100mL de agua desionizada. Esperar a que no se desprenda más gas, almacenar en frasco de plástico. Todo este proceso debe ser realizado en la campana de extracción.

8.4. Solución de molibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_2 4.4H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2):

Disolver 10 g de molibdato de amonio tetrahidratado en agua desionizada, con agitación y suave calentamiento. Diluir a 100mL. Filtrar si es necesario. Ajustar el pH entre 7-8, con NaOH o hidróxido de amonio (NH_4OH).

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

8.5. Solución de ácido oxálico ($H_2C_2O_4.2H_2O$ Nro. CAS 6153-56-6):

Disolver 7,5 g de ácido oxálico mono-hidratado o 8,75 g de ácido oxálico di-hidratado en agua desionizada y diluir a 100 mL.

8.6. Solución stock de sílice (aprox. 1 g de SiO_2/L):

Disolver 4,73 g de metasilicato de sodio nanohidratado ($Na_2SiO_3.9H_2O$ Nro. CAS 13517-24-3) en agua desionizada y diluir a 1000 mL en matraz aforado. Como alternativa puede utilizarse MRC (Material de Referencia Certificado).

8.7. Solución estándar de 100 mg de SiO_2/L (Nro. CAS 7631-86-9):

Diluir 1,00 mL de la solución stock en 10 mL de agua desionizada; 1,00 mL = 100 µg SiO_2

Calcular la concentración exacta a partir de la concentración stock.

8.8. Solución de control de silicatos de 1000 mg SiO_2/L: Ver preparación en el manual de Control de Calidad Analítico- Laboratorio Ambiental de DINACEA. Alternativamente se puede utilizar un estándar comercial de concentración con valor certificado y realizar las diluciones correspondientes (Sigma Aldrich BCCB8928 o similar).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Durante el análisis, las muestras a analizar deben tener el menor contacto posible con el vidrio.
9.2. Todo el material de vidrio debe encontrarse en óptimas condiciones de limpieza. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una curva de calibración con una serie de al menos seis estándares a partir de la solución de trabajo de 100 mg SiO_2/L, dentro del rango de linealidad de la técnica. Para un volumen final de 25 mL en los tubos, realizar las siguientes tomas sugeridas:

Conc. Std. (mg SiO_2/L)	masa sol. estándar (g)	masa final (g)	Conc. aprox. final (mg SiO_2/L)
100	0,00	25	0
100	0,10	25	0,4
100	0,20	25	0,8
100	0,50	25	2,0
100	0,75	25	3,0
100	1,50	25	6,0
100	2,5	25	10
100	3,5	25	14

10.2. La curva de calibración puede ser preparada con material aforado o directamente en los tubos o celdas de lectura, registrando los pesos de las tomas de solución de trabajo y del volumen final utilizando balanza de resolución de 0,001 g, para cada punto de la curva. Si las tomas son realizadas en peso, considerar densidad de 1g/mL.Determinar la absorbancia cero del espectrofotómetro con un blanco de agua 8.1, y leer las absorbancias de todas las soluciones estándares a 410 nm (Abs 0).
10.3. Agregar en rápida sucesión 0,5 mL de ácido clorhídrico (1 + 1) y 1,0 mL de molibdato de amonio. Tapar y mezclar por inversión por lo menos 6 veces y esperar de 5 a 10 minutos.
10.4. Luego agregar 1,0 mL de solución de ácido oxálico y agitar vigorosamente. Leer la absorbancia a 410 nm, entre los 2 y 15 minutos (Abs 1).

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Desarrollo de color:

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

Nota 3: Volumen mínimo de muestra para realizar la dilución en el propio tubo de 5mL; pudiendo realizar una dilución máxima de 5 veces.

11.2. Determinar la absorbancia cero del espectrofotómetro con un blanco de agua (8.1), y leer las absorbancias de todas las soluciones muestras a 410 nm. (Abs 0)
11.3. Proceder de la misma forma que en los puntos 10.5 y 10.6.

Corrección por color o turbidez:

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

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

Nota 4: Para la detección de presencia de sílice no reactiva al molibdato de amonio, digerir la muestra con $NaHCO_3$, antes de la determinación de color. Esta digestión puede que no sea suficiente para convertir toda la sílice no reactiva al Molibdato de Amonio a la forma reactiva. Para la realización de la digestión, referirse a la bibliografía.

Si se realiza la digestión, debe ser declarado junto con el resultado de la muestra.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1.

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

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

$$Abs_{estándar} = a \times (mg\ SiO_2/L) + b$$

donde:

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

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

$$Sílice,\ mg\ SiO_2/L = \frac{(Absmuestra - b) \times FD}{a}$$

donde:

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada 5 muestras de aguas naturales o mínimo 1 por batch, realizar la medición por duplicado e informar el promedio de ambos valores. La precisión puede ser evaluada tanto por desviación estándar relativa como por rangos, el criterio de aceptación será de un 15% hasta que se cuente con el gráfico de control correspondiente según Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de exactitud:** Analizar la solución de Control simultáneamente con las muestras. Se puede también emplear como solución de control una solución comercial de referencia. Verificar que el porcentaje de recuperación este dentro de los límites de control, aceptando un apartamiento del 15%, hasta obtener los gráficos correspondientes según Manual de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Fortificar al menos 1 cada 5 muestras, o por lo menos una muestra en el batch, con la solución “Control de Silicato”. La cantidad adicionada, deberá brindar una concentración correspondiente a la mitad de la curva o menor. Se deberá utilizar una solución de concentración tal que evite diluir la muestra con la adición (máximo 5 % en volumen). Verificar que el porcentaje de recuperación este dentro de los límites de control, aceptando un apartamiento del 20%, hasta obtener el gráfico de control correspondiente según Manual de Calidad Analítico.

Nota 5: Cuando los resultados no se encuentren dentro de los rangos establecidos se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis. (Según Manual de Control de Calidad Analítico)

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Silica 4500 A Introduction, C Molibdosilicate Method. pp. 497 a 498.

14.2. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Vol. 30 No. 1 (1951). “The Determination of Silicate in Sea Water” F.A.J. Armstrong. Experimental Officer at the Plymouth Laboratory pp. 149 a 160.

1019UY

Determinación de sólidos sedimentables en aguas naturales y efluentes industriales líquidos

Método potenciométrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - J. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Ruta de análisis (RFQ 16).

2.6. Planilla de cálculo electrónica.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se homogeniza la muestra y se coloca en un cono Imhoff. Se realiza la lectura del volumen generado del sedimento a los 60 o 120 minutos según solicitud del cliente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica y guantes.

5. INTERFERENCIAS

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

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se recogen las muestras en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de capacidad un litro.

6.2. Se conserva la muestra a ≤ 6 °C (> 0 °C) durante un período de 48 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

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

7.2. Varilla de vidrio.

8. REACTIVOS

8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Se recomienda iniciar el análisis lo antes posible para reducir al mínimo la descomposición microbiológica de los sólidos.

9.2. Realizar el análisis dentro de las 48 horas.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Homogeneizar agitando por inversión repetidas veces la muestra previo a su colocación en el cono Imhoff.

11.2. Se coloca un litro de la muestra en un cono Imhoff.

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

11.4. A los 60 o 120 minutos se realiza la lectura, de acuerdo a lo solicitado.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Los resultados se expresan en mL de sólidos sedimentables /L de muestra observado a los 60 o 120 minutos.

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

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Método 2540 A Solids Introduction y F Settleable Solids pp 142 al 143 y 147 al 148.

1020UY

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

Método gravimétrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - J. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles en aguas naturales y efluentes líquidos (industriales y domésticos).

1.2. El término Sólidos Suspendidos se aplica a la parte de los sólidos totales retenida por un filtro de fibra de vidrio.

1.3. El término Sólidos Suspendidos Totales se aplica a los residuos de material que quedan en un filtro después de la evaporación en estufa a 103 - 105 °C. Los Sólidos Suspendidos Fijos corresponden a los residuos remanentes del incinerado a 550 °C y los Sólidos Suspendidos Volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 °C (que dan una aproximación de la cantidad de materia orgánica presente en la muestra).

1.4. Mediante este procedimiento se pueden determinar los sólidos suspendidos desde 9,2 mg/L hasta 2,0E+04 mg/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de bombas de vacío (INE 01, INE 02).

2.6. Instructivo de uso de mufla (INE 27).

2.7. Instructivo de uso de estufas 104 °C (INE 101, INE 107).

2.8. Instructivo de uso de balanzas (INE 93, INE 16A, INE 16B, INE 153).

2.9. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.10. Ruta de análisis (RFQ 17).

2.11. Planillas de cálculo electrónicas.

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica y guantes descartables.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Se eliminan de la muestra las partículas gruesas flotantes o los aglomerados sumergidos de materiales no homogéneos, si se decide que su inclusión no es deseable en el resultado final.

5.2. Se debe disminuir el volumen de muestra a filtrar para que el material retenido proporcione un residuo no mayor a 200 mg.

5.3. Las muestras ricas en sólidos disueltos exigen un lavado meticuloso del filtro luego del filtrado de la muestra, para asegurar la eliminación de todo el material disuelto.

5.4. Las muestras ricas en sólidos suspendidos pueden obstruir el filtro antes de terminar el filtrado y producir resultados altos debido a una cantidad excesiva de material coloidal capturado en el filtro obturado. En ese caso se recomienda disminuir el tamaño de la muestra, repitiendo el análisis.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se recogen las muestras en frascos de plástico (polietileno o equivalente). Para muestras de aguas naturales recoger aproximadamente 2000mL; para muestras de efluentes líquidos es suficiente un volumen menor (1000mL).

6.2. Se conserva la muestra a ≤6 °C (>0 °C) durante un período de siete días como máximo. De preferencia analizar dentro de las 24 horas para reducir al mínimo la descomposición microbiológica de los sólidos.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Estufa para operar a 103 - 105 °C

7.2. Mufla para operar a 550 °C ± 50 °C

7.3. Desecador provisto de un desecante con un indicador de color.

7.4. Balanza de resolución mínima de 0,00001 g para peso de crisoles.

7.5. Balanza de resolución mínima de 0.01 g para dilución de solución control.

7.6. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 1000 mL

7.7. Bomba de vacío

7.8. Destilador o desionizador de agua

7.9. Pinzas de metal para manipular los crisoles

7.10. Pinzas de metal para manipular los filtros

7.11. Probetas de vidrio o plástico de 50, 100, 250 y 500 mL de capacidad

7.12. Erlenmeyer 250 mL

7.13. Pipeta automática de 1 - 10 mL

7.14. Crisoles o cápsulas de porcelana

7.15. Filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, tamaño de poro 2,0 µm o menor.

De acuerdo a bibliografía de referencia los filtros habilitados son: Whatman grade 934AH; Gelman type A/E; Millipore type AP40; E-D Scientific Specialties grade 161; Enviromental Express Pro Weigh; u otro que proporcione resultados equivalentes (ejemplo: Advantec GC50)

8. REACTIVOS

8.1. Silica gel con indicador de color para determinar la existencia de hidratación.

8.2. Solución Control de Sólidos Suspendidos: suspensión de celulosa microcrostalina (500 mg/L): Ver preparación en el manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA (PGC04).

8.3. Agua desionizada (según ES 01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Es importante secar los residuos a la temperatura indicada debido a que ésta puede influir considerablemente en el resultado.

9.2. Antes de filtrar la muestra se debe homogenizar bien agitando el recipiente por inversión reiteradas veces.

9.3. Se debe pesar el filtro con el crisol inmediatamente después de sacarlo del desecador para evitar un cambio de peso al exponerlos al ambiente por hidratación.

9.4. Tener especial cuidado con el estado de los desecadores (juntas, cierres, color de la sílica).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación del filtro

11.1. Se coloca un filtro de fibra de vidrio con el lado rugoso hacia arriba en el portafiltro de un embudo Büchner, conectado a un frasco de succión y al sistema de vacío.

11.2. Se enciende el sistema de vacío y se lava el filtro con tres volúmenes sucesivos de aprox. 20mL de agua (según 8.3).

11.3. Se continúa la succión hasta eliminar toda el agua. Se apaga la bomba. Se retira cuidadosamente el filtro del embudo con una pinza y se transfiere a un crisol o una cápsula de porcelana que sirve como portador del filtro.

11.4. Si se va a determinar únicamente Sólidos suspendidos totales: Se seca el filtro dentro del crisol en la estufa a 103 - 105 °C durante el tiempo necesario (ver nota). Se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de resolución de 0,01 mg.

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

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

11.5. Si se van a determinar Sólidos suspendidos fijos y volátiles, se seca el filtro dentro del crisol en la mufla a 550 °C ± 50 °C durante el tiempo necesario (ver nota), se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de resolución de 0,01 mg.

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

El Laboratorio Ambiental de DINACEA realizó la validación, lográndose peso constante del filtro luego de incineración en mufla para sus condiciones y equipos en 30 minutos.

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

Procesamiento de la muestra

11.7. Se pesa el filtro (previamente preparado) en el crisol con una resolución de 0,01 mg inmediatamente antes de usar. **Se registra en la ruta de análisis como P1.**

11.8. Se coloca el filtro de fibra de vidrio en el portafiltro del embudo. Se moja el filtro con un pequeño volumen de agua (según 8.3). Se agita la muestra repetidas veces por inversión y se toma un volumen adecuado de la misma. Para aguas naturales por características de las mismas los volúmenes a filtrar son mucho mayores que para el caso de las muestras provenientes de efluentes industriales. Para estos últimos filtrar al menos 20 mL (menos de esta cantidad no se considera muestra representativa). En caso que el cliente solicite el análisis de sólidos suspendidos en una muestra que filtra menos de 20mL, informar estimado y con la siguiente observación: “Características de la muestra no permiten filtrar el volumen mínimo requerido por la técnica de sólidos suspendidos”.

Nota 3: Se elige un volumen de muestra que proporcione un residuo de entre 2,5 y 200 mg de residuo seco. Para muestras de efluentes filtrar máximo 1 Litro y para muestras de aguas máximo 2 Litros si es necesario. Si se requiere más de 10 minutos para filtrar la muestra, se descarta el filtro y deberá filtrarse un volumen menor de muestra.

11.9. Después de la filtración de la muestra, se lava el filtro con agua (según 8.3).

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

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

11.11. Se seca el filtro con el residuo en el crisol en la estufa a 103–105 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante, luego se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de resolución de 0,01 mg. Se registra en la ruta de análisis como P2.

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

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

11.12. Se coloca el filtro con el residuo en el crisol en la mufla a 550 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante luego se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa el crisol con el filtro en balanza analítica de resolución de 0,01 mg. **Se registra en la ruta de análisis como P3.**

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

El Laboratorio Ambiental de DINACEA realizó la validación, lográndose peso constante de incineración en mufla para sus condiciones y equipos en 30 minutos tanto para muestras de efluentes como para aguas naturales.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

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

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

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

donde:

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

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

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

V corresponde al volumen de la muestra en mL.

Nota 7: En caso de que el residuo seco obtenido sea menor a 2,5 mg y se hayan filtrado 2 litros de muestra, el resultado se informa como menor al límite de cuantificación dividido entre 2.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

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

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

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

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Solids 2540 A Introduction, D Total Suspended Solids Dried From 103 to 105 °C y E Fixed and Volatile Solids Ignited at 550 °C. pp 142-143 y 146-147.

1021UY

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

Método gravimétrico

Elaborado – M. Menéndez

Modificado – J. Martínez

Revisado – P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado – N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de sólidos totales, fijos y volátiles en agua naturales y efluentes líquidos.

1.2. El término sólidos totales se aplica a los residuos de material que quedan en un recipiente después de la evaporación en estufa a 103 - 105 °C. Los Sólidos Fijos corresponden a los residuos sólidos remanentes del calentamiento a 550 °C y los Sólidos Volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 °C.

1.3. Mediante este procedimiento se pueden determinar los sólidos totales en un rango de 24 mg/L a 20.000 mg/L, de acuerdo a lo indicado por el método de referencia.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivos de uso de mufla (INE 27).

2.6. Instructivos de uso de los baños de agua (INE 32, INE 81).

2.7. Instructivos de uso de estufas (INE 101, INE 107).

2.8. Instructivos de uso de balanzas (INE 93, INE 94).

2.9. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.10. Ruta de análisis (RFQ 15).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica y guantes de látex descartables.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Se eliminan de la muestra las partículas gruesas flotantes o los aglomerados sumergidos de materiales no homogéneos si se decide que su inclusión no es deseable en el resultado final.

5.2. En caso de residuo excesivo, se debe disminuir el volumen de la muestra para que proporcione un residuo no mayor de 200 mg dado que la misma puede formar una capa conteniendo agua no permitiendo su liberación.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se recogen las muestras en frascos de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de capacidad un litro. Para muestras de aguas naturales recoger aproximadamente 500mL; para muestras de efluentes líquidos es suficiente un volumen menor.

6.2. Se conserva la muestra refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C) durante un período de siete días como máximo. De preferencia analizar lo antes posible, para reducir al máximo la descomposición microbiológica de los sólidos.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Baño de agua con soporte para cápsulas
7.2. Estufa para operar a 103 - 105 °C
7.3. Mufla para operar a 550 °C +/- 50°C
7.4. Desecador provisto de un desecante que contiene un indicador de color para la concentración de humedad (sílica gel)
7.5. Balanza de resolución 0,0001 g
7.6. Cápsula de porcelana de capacidad mínima 100mL
7.7. Probeta de vidrio o plástico de 50mL
7.8. Pinzas metálicas para manejo de cápsulas
7.9. Destilador o desionizador de agua

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES01)
8.2. Solución de Control de Sólidos Totales: ver preparación en el manual de Calidad Analítico- Laboratorio Ambiental de DINACEA.
8.3. Sílica gel con indicador de color para determinar la existencia de hidratación.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Es importante secar los residuos a la temperatura definida, debido a que ésta puede influir considerablemente en el resultado.
9.2. Antes de transferir la muestra a la cápsula de evaporación, se debe homogeneizar por inversión repetidas veces.
9.3. Se debe pesar la cápsula de evaporación inmediatamente después de sacarla del desecador para evitar un cambio de peso al exponer la cápsula con los sólidos al ambiente.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación de las cápsulas

11.1. Secar la cápsula de porcelana limpia en la estufa durante una hora a 103 - 105 °C. Si se van a medir sólidos fijos y volátiles se debe colocar la cápsula en una mufla durante 30 minutos a 550 °C.

Análisis de la muestra

11.2. Colocar la cápsula en un desecador hasta equilibrar la temperatura ambiente y pesar (P1).

11.3. Agitar la muestra por inversión para homogeneizar; tomar un volumen adecuado de la muestra, de forma tal de que sea conveniente para generar un residuo seco mínimo de 2,5 mg y máximo de 200 mg.

La toma puede ser realizada con probeta graduada (toma habitual de trabajo: 50mL, considerando 20mL como mínimo) y transferirlo a la cápsula, previamente tratada según punto 11.1 y pesada.

Si se observa que la muestra se adhiere a las paredes del frasco, se recomienda sea informado.

11.4. Evaporar la muestra en un baño de agua hasta sequedad y luego secar la cápsula con el residuo de la muestra en la estufa durante el tiempo necesario para lograr peso constante a 103 - 105 °C.

11.5. Colocar la cápsula en un desecador hasta lograr la temperatura ambiente y pesar (P2).

Nota 1: Cada laboratorio debe determinar el tiempo necesario de secado para obtener peso constante, o hasta que el cambio en el peso sea menor al 4 % del peso anterior o una diferencia de hasta 0,5 mg.

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

11.6. Incinerar la muestra en la mufla a 550 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante.
11.7. Colocar la cápsula en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y pesar (P3).

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

El Laboratorio Ambiental de DINACEA realizó la validación, lográndose peso constante de incineración en mufla para sus condiciones y equipos en 30 minutos, tanto para muestras de efluentes como para aguas naturales.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

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

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

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

Donde:

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

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

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

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Se analiza 50mL de la solución de Control de Sólidos Totales simultáneamente con cada serie de muestras. Verificar que el porcentaje de recuperación esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente. De lo contrario proceder de acuerdo a lo establecido al Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de una de cada 5 muestras, mínimo una por serie de muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control correspondiente. Si dicho resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Control de blancos:** Incluir en cada batch el análisis de 1 blanco, realizando una toma de 50mL de agua 8.1. Procesar simultáneamente con las muestras. El valor de sólidos totales obtenido debe ser menor que el LC de la metodología. Si es igual o mayor repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Solids 2540 A Introduction, B Total solids dried at 103 °C -105 °C y E Fixed and Volatile Solids Ignited at 550 °C. pp 142-144 y 147.

1022UY

Determinación de la turbidez en aguas naturales

Método nefelométrico

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de la turbidez en muestras líquidas. Este método es adecuado para muestras de agua naturales o agua proveniente de plantas de tratamiento que se asemejen a aguas naturales. Se puede determinar la turbidez entre 1 NTU y 4000 NTU. El límite de cuantificación es de 1 NTU.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivo de uso de turbidímetro (INE 92).
2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A, INE 16B, INE 94).
2.7. Instructivo de uso del baño de ultrasonido (INE 69).
2.8. Instructivo de uso del destilador y desionizador de agua (INE 109, INE121).
2.9. Ruta de análisis (RFQ 18).
2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

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

5. INTERFERENCIAS

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

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

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

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. La sensibilidad del equipo debe permitir diferenciar turbidez de 0,02 NTU o menor, en el rango menor de la escala para aguas con turbidez menor a 1 NTU.

7.2. Turbidímetro criterios de diseño:

a. Fuente de luz: lámpara con filamento de tungsteno que opere a una temperatura de entre 2200 y 3000°K.

b. La distancia atravesada por la luz incidente y la luz dispersada en el tubo de muestra no debe exceder los 10 cm.

c. El ángulo de la luz aceptado por el detector: centrado en 90 + 30° para la luz incidente, si se utiliza un filtro se necesita un pico espectral entre los 400 y 600 nm.

7.3. Celdas adecuadas para el turbidímetro, de vidrio o plástico.

7.4. Matraces aforados de 100mL.

7.5. Pipetas aforadas de 5 y 10mL.

7.6. Balanza de resolución de 0,01 g

7.7. Balanza de resolución de 0,0001 g

7.8. Baño de ultrasonido.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (Según ES 01).

8.2. **Suspensión estándar de formazida:**

Solución I:

Disolver 1,000 g de sulfato de hidrazina, $(NH_2)2.H_2SO_4$ Nro. CAS. 10034-93-2, en agua desionizada y diluir a 100mL en matraz aforado (el sulfato de hidrazina es cancerígeno, evitar la ingestión, inhalación y el contacto con la piel).

Solución II:

Disolver 10,00g de hexametilen- tetraamina, $(CH_2)6N_4$ Nro. CAS. 100-97-0, en agua desionizada y diluir a 100mL en matraz aforado.

8.3. **Suspensión stock de 4000 NTU:**

En un matraz mezclar 5,00mL de solución I con 5,00mL de solución II. Dejar reposar 24 h a 25 °C ± 3 °C, la suspensión resultante es de 4000 NTU.

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

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

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

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Homogenizar la muestra agitando varias veces y medir la turbidez rápidamente para prevenir cambios de temperatura, floculación y sedimentación de partículas.

9.2. Es necesario eliminar todas las burbujas que contenga la muestra antes de su medición.

9.3. En caso de almacenamiento y refrigeración de la muestra, dejar alcanzar temperatura ambiente antes de realizar el análisis

9.4. Evitar siempre que sea posible la realización de diluciones, dado que se puede producir la dilución de partículas en suspensión lo que puede redundar en el cambio en otras características de la muestra.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Según el instructivo del equipo INE 92.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Medir la turbidez lo más pronto posible después de tomada la muestra, para evitar cambios de temperatura de la muestra y la floculación o sedimentación de partículas que cambien las características de la misma. De lo contrario tomar en cuenta lo establecido en el apartado 6. Si se detecta la floculación de la muestra, romper los agregados con agitación.

11.2. Agitar la muestra por inversión varias veces inmediatamente antes de realizar el análisis, colocar en la celda de medición desgasificar y leer la turbidez directamente del display del equipo.

11.3. Se logra la desgasificación de la muestra al colocar la celda de medición por 1 - 2 segundos en un baño de ultrasonido, eliminado toda burbuja y aire que contenga (verificar que las celdas usadas sean aptas para baño de ultrasonido).

11.4. La muestra debe estar a temperatura ambiente, para evitar que la celda se empañe por condensación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

Turbidez (NTU) = Turbidez leída x FD

donde: FD = Volumen final / Toma de muestra

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

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Se realiza un duplicado cada tres muestras, y como mínimo un duplicado por serie de medidas. Se aceptará si el valor del rango normalizado obtenido es menor o igual al 15% de la medición del duplicado, hasta contar con el gráfico de control correspondiente. En caso de desvío, consultar el Manual de Control de Calidad Analítico y evaluar la repetición del análisis.

13.2. **Control de exactitud:** Si fuera posible, utilizar un material de referencia certificado de concentración menor a 50 NTU; aceptando una diferencia máxima con el valor del certificado de un 10 %. En caso de no disponer del mismo, preparar una solución independiente tal como se describe en 8.2, 8.3 y 8.4.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023”Methods 2130 A Introduction, 2130 B Turbidity Nephelometric Method pp.88-91.

1023UY

Determinación de sólidos disueltos en aguas naturales y efluentes líquidos

Método gravimétrico

Elaborado - S. Azambuya

Modificado - J. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de sólidos disueltos totales, fijos y volátiles, en aguas naturales y efluentes líquidos (industriales y domésticos).

1.2. El término Sólidos disueltos se aplica a la fracción de los sólidos totales que pasa a través de un filtro de fibra de vidrio con un tamaño de poro nominal de 2,0 µm (o menor) bajo determinadas condiciones. El filtrado obtenido se lleva a evaporación en baño de agua y posteriormente es secado en estufa a 180 ± 2˚C hasta obtención de peso constante. Los Sólidos Disueltos Fijos corresponden a los residuos remanentes del incinerado a 550 ± 50 °C y los Sólidos Disueltos Volátiles corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación a 550 ± 50 °C.

1.3. Mediante este procedimiento se pueden determinar los sólidos disueltos en un rango que va desde 28 mg/L hasta 2,0E+04 mg/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de bombas de vacío (INE 01-INE 02).

2.6. Instructivo de uso de estufa (INE 107).

2.7. Instructivo de uso de mufla (INE 27).

2.8. Instructivo de uso de balanza (INE 94).

2.9. Instructivo de uso de los baños de agua (INE 32, INE 81).

2.10. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.11. Ruta de análisis (RFQ 41).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La muestra bien homogeneizada se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio. Luego, se transfiere el filtrado a una cápsula. Este filtrado se evapora a sequedad en baño de agua y posteriormente se coloca en estufa a 180 ± 2°C hasta obtención de peso constante. La diferencia entre el peso final y el de la cápsula sin el residuo se corresponde al valor de Sólidos Disueltos.

3.2. El resultado obtenido puede diferir del valor teórico que pueda determinarse a partir del análisis químico de la muestra. El filtrado recolectado para la determinación de sólidos suspendidos puede ser utilizado para determinar Sólidos disueltos

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica y guantes descartables.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Aguas altamente mineralizadas con cantidades importantes de calcio, cloruro, magnesio o sulfato pueden ser higroscópicas y requerirán un secado más prolongado, una apropiada desecación y una pesada rápida. Muestras con altas concentraciones de bicarbonato requieren un cuidadoso secado de modo de asegurar que todo el bicarbonato es convertido a carbonato. Los residuos secados a 180 ± 2 °C pierden casi toda el agua ocluida, pero algo de agua de cristalización puede permanecer, especialmente si hay presencia de sulfato. La materia orgánica puede volatilizarse y perderse, pero eventualmente puede no ser completamente removida.

5.2. Se debe disminuir el volumen de muestra a filtrar para que el material disuelto proporcione un residuo no mayor a 200 mg, dado que un residuo mayor puede formar una corteza (especie de costra que se forme en la cápsula de acuerdo a características de la muestra), que ocasione atrapamiento de agua, modificando el resultado del análisis.

5.3. Las muestras ricas en sólidos disueltos exigen un lavado meticuloso del filtro luego de que se filtra la muestra, asegurando así que el filtrado contenga la totalidad del material disuelto.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se recogen las muestras en frascos de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de capacidad un litro. Para muestras de aguas naturales recoger aproximadamente 500mL; para muestras de efluentes líquidos es suficiente un volumen menor.

6.2. Se conserva la muestra a ≤6 °C (>0 °C) durante un período de siete días como máximo. De preferencia analizar lo antes posible, para reducir al mínimo la descomposición microbiológica de los sólidos.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Estufa para operar a 180 ± 2 °C

7.2. Mufla para operar 550 ± 50 °C

7.3. Baño de agua con soporte para cápsulas.

7.4. Desecador provisto de un desecante con un indicador de color.

7.5. Balanza de resolución 0,0001 g

7.6. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 1000mL.

7.7. Bomba de vacío.

7.8. Destilador o desionizador de agua.

7.9. Pinzas de metal para manipular las cápsulas.

7.10. Pinzas de metal para manipular los filtros.

7.11. Probetas de vidrio o plástico de 50mL de capacidad

7.12. Cápsulas de porcelana de capacidad 100mL o más.

7.13. Filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, tamaño de poro 2,0 µm o menor.

De acuerdo a bibliografía de referencia los filtros habilitados son: Whatman grade 934AH; Gelman type A/E; Millipore type AP40; E-D Scientific Specialties grade 161; Enviromental Express Pro Weigh; u otro que proporcione resultados equivalentes (ejemplo: Advantec GC50).

8. REACTIVOS

8.1. Sílica gel con indicador de color para determinar la existencia de hidratación.

8.2. Solución Control de Sólidos Disueltos 1: solución de agua comercial sin gasificar, con una concentración conocida de sólidos disueltos.

8.3. Solución Control de sólidos disueltos 2 (opción alternativa): disolver 300mg de NaCl previamente secados a (105-103) °C durante una hora, en 1L de agua según ES01.

8.4. Agua desionizada (Según ES 01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Es importante secar los residuos a la temperatura indicada debido a que ésta puede influir considerablemente en el resultado.

9.2. Antes de filtrar, la muestra se debe homogenizar bien agitando el recipiente por inversión reiteradas veces.

9.3. Se debe pesar la cápsula inmediatamente después de sacarla del desecador para evitar un cambio de peso al exponer la capsula con los sólidos al ambiente.

9.4. Tener especial cuidado con el estado de los desecadores (juntas, cierres, color de la sílica).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

11.1. Se colocan las cápsulas en estufa a 180°C durante una hora. Si se van a determinar sólidos disueltos fijos y volátiles, las cápsulas se llevan a 550°C en mufla durante 30 minutos.

11.2. Inmediatamente a esta operación, se ubican en desecador y cuando alcanzan temperatura ambiente se registra su peso en la ruta de análisis (P1), con una precisión de 0,1mg.

11.3. Se coloca un filtro de fibra de vidrio en el portafiltro de un embudo Büchner, conectado a un frasco de succión y al sistema de vacío.

11.4. Se enjuaga el filtro con agua según ES 01, tres veces con un volumen de al menos 20mL cada vez antes de comenzar el análisis, descartando estas aguas de lavado.

Procesamiento de la muestra

11.5. Agitar la muestra por inversión para homogeneizar; tomar un volumen adecuado de la muestra, de forma tal de que sea conveniente para generar un residuo seco mínimo de 2,5mg y máximo de 200mg.

11.6. Filtrar el volumen requerido de muestra (toma habitual de trabajo: 50mL). Si la filtración demora más de 10 minutos, se puede aumentar el tamaño del poro del filtro a usar o disminuir el volumen de muestra a filtrar. Transferir el filtrado de la muestra a una cápsula y colocar en baño de agua.

11.7. Una vez que se completó la evaporación en baño de agua a ebullición, la cápsula con el residuo se lleva estufa a 180 ± 2˚C durante el tiempo necesario para obtener peso constante.

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

El Laboratorio Ambiental de DINACEA realizó la validación, lográndose peso constante de secado en estufa para sus condiciones y equipos en 2 horas.

11.8. Posteriormente se coloca la cápsula con el residuo resultante en desecador y una vez alcanzada temperatura ambiente se pesa en balanza analítica de precisión de 0,1 mg. **Se registra en la ruta de análisis como P2**.

11.9. Si se van a determinar sólidos disueltos fijos y volátiles se coloca la cápsula con el residuo en la mufla a 550 ± 50 °C durante el tiempo necesario para lograr peso constante. Luego se coloca en desecador y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesa la cápsula con el residuo en balanza analítica de precisión de 0,1 mg. **Se registra en la ruta de análisis como P3.**

Nota 2: Se repite el ciclo de secado, colocación en desecador y pesada hasta obtener un peso constante o hasta que la variación en el peso sea menor a 0,5 mg. Cada laboratorio debe evaluar los tiempos de la muestra en la estufa en que se aseguran estas condiciones.

El Laboratorio Ambiental de DINACEA realizó la validación, lográndose peso constante de secado en estufa para sus condiciones y equipos en 30 minutos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Se calcula la concentración de los sólidos disueltos en la muestra mediante de las siguientes ecuaciones:

Sólidos Disueltos Totales, mg/L = (P2 -P1) x 1000000 / V

Sólidos Disueltos Fijos, mg/L = (P3 -P1) x 1000000 / V

Sólidos Disueltos Volátiles, mg/L = (P2 -P3) x 1000000 / V

Donde:

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

P2: Corresponde al peso de la cápsula más el residuo en g luego de secado en estufa.

P3: Corresponde al peso de la cápsula más el residuo en g luego de incinerado en mufla.

V: Corresponde al volumen de la muestra en mL

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado cada 5 muestras, o al menos 1 duplicado por serie de muestras. Obtener de la planilla de cálculo los valores de rangos normalizados para los duplicados y verificar que los mismos se encuentren bajo control, siendo 10% el valor máximo aceptado de dispersión, hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la exactitud:** Se analiza una toma de 50mL de la solución control de Sólidos Disueltos simultáneamente con cada serie de muestras. Obtener el porcentaje de recuperación de la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes, siendo estos 80 – 120 % el rango de aceptación, hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si dicho resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico

13.3. **Control de Blancos:** Incluir cada día de análisis 1 blanco, filtrando 50mL de agua desionizada (según ES 01) y procediendo del mismo modo que con las muestras. Procesar simultáneamente con las muestras. El valor de sólidos disueltos totales obtenido debe ser menor que el LC de la metodología. Si es igual o mayor repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Solids 2540 A Introduction, C Total Dissolved Solids Dried From 180 °C y E Fixed and Volatile Solids Ignited at 550 °C. pp 142-143, 145 y 147.

1025UY

Determinación de Potencial Óxido-Reductor en matrices líquidas y sólidas

Método potenciométrico

Elaborado - Vivian Muñoz

Modificado - M. Martínez

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de potencial óxido-reductor en matrices líquidas: aguas naturales, efluentes industriales y matrices sólidas tales como suelos, sedimentos o residuos sólidos.

Esta determinación es también utilizada como insumo para la determinación de Cromo VI en matrices sólidas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos- Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Ruta de análisis (RFQ 31).

2.6. Instructivos de uso de analizadores de iones (INE 142).

2.7. Instructivos de uso de balanzas (INE 16A, INE 16B).

2.8. Instrucciones de uso para electrodo FQ 682.

2.9. Manual de instrucciones de uso para electrodo redox de platino Orion 96-78.

2.10. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 82, INE 109, INE 121).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La determinación se basa en la medida de la diferencia de potencial generada por la muestra entre un electrodo inerte, usualmente de platino y un electrodo de referencia. Generalmente se utiliza como electrodo de referencia un electrodo de plata / cloruro de plata, cuyo potencial es agregado a la medida de potencial registrada para obtener un valor expresado en base al electrodo de hidrógeno estándar.

En un equipo combinado ambos electrodos se encuentran en el mismo cuerpo, conectados por una solución salina que actúa como puente entre ellos.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los electrodos redox de platino pueden dar lecturas inestables en soluciones conteniendo cromo, vanadio u otros agentes reductores más fuertes que el platino.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Realizar el análisis tan pronto como sea posible, o si corresponde en el momento de realizar la determinación de cromo seis.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).

7.2. Electrodo combinado platino-electrodo de referencia (Orion 96-78), con soluciones de relleno Orion 90-00-01 u Orion 90-00-11. (Medida directa).

7.3. Electrodo Oakton WD-35805-13 o similar (Medida en el sobrenadante).

7.4. Agitador magnético y barras magnéticas de agitación.

7.5. Erlenmeyer de 150 mL.

7.6. Matraz aforado de 100 mL.

7.7. Placa de Petri.

7.8. Vaso de bohemia 50 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (Según ES01).

8.2. Soluciones de chequeo del electrodo:

Solución A: (0.1M Ferrocianuro de potasio - 0.05M Ferricianuro de potasio): Pesar 4.22g de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ grado reactivo y 1.65g de $K_3Fe(CN)_6$. Colocar en un matraz aforado de 100 mL. Agregar 50mL de agua destilada y agitar hasta disolver. Llevar a volumen con agua 8.1.

Solución B: (0.01M Ferrocianuro de potasio – 0.05M Ferricianuro de potasio): Pesar 0.42g de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ grado reactivo , 1.65g de $K_4Fe(CN)_6$ y 3.39g de $KF.2H_2O$ grado reactivo. Colocar en un matraz aforado de 100 mL. Agregar 50mL de agua destilada y agitar hasta disolver. Llevar a volumen 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 (ES01).

9. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

9.1. La elección adecuada de la solución de relleno para el electrodo combinado minimiza la contaminación de las muestras con cloruros.

La solución Orion 90-00-01 (o similar) será utilizada para muestras de soluciones diluidas (fuerza iónica menor a 0.2M). Cuando la medida se realiza en una solución concentrada la solución de relleno deberá ser una solución saturada de KCl, saturada con AgCl (Orion 90-00-11 o similar).

9.2. En el caso de que la muestra a analizar sea un sólido, esta deberá poseer cierto porcentaje de humedad. Para el caso de los suelos, se evalúa la humedad de estos por las características al mojarse. Solo deben colorearse débilmente cuando son mojados.

9.3. Enjuagar el electrodo antes y después de usar.

10. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

Chequear el electrodo:

10.1. Conectar el electrodo al analizador de iones y seleccionar el modo de medición mV. En el caso del electrodo Orion 96-78 la solución de relleno a utilizar deberá ser la 90-00-01.

10.2. Transferir la solución A, a un erlemeyer de 150 mL y colocar el electrodo dentro de la solución hasta que la lectura se estabilice. Registrarla en el RFQ31.

10.3. Enjuagar el electrodo y repetir la medida con la solución B. Registrar en el RFQ31.

10.4. El potencial para la solución B deberá ser de 66±10 mV mayor que la solución A.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

PARA MUESTRAS LÍQUIDAS

11.1. Si el electrodo utilizado es el Orion 96-78 o similar, rellenar el mismo con la solución correspondiente según se trate de una solución diluida (fuerza iónica debajo de 0.2M) o concentrada. El electrodo Oakton WD-35805-13 posee un relleno de concentración correspondiente a la solución Orion 90-00-11.

11.2. Colocar la muestra en un erlenmeyer y agitar con agitador magnético.

11.3. Introducir el electrodo. Esperar a que la medida estabilice y registrar el E0.

11.4. Medir la temperatura de la muestra en el momento de la lectura del potencial.

PARA MUESTRAS SOLIDAS

Medida directa

11.5. Si corresponde llenar el electrodo con la solución de relleno 90-00-11 (o similar).

11.6. Colocar la muestra a temperatura ambiente en una placa de petri.

11.7. Introducir el electrodo en la muestra 2 o 3cm, esperar que estabilice. Registrar el potencial E0.

11.8. Medir la temperatura ambiente. Medida en el sobrenadante (utilizado como insumo en la determinación de Cromo VI en matrices sólidas).

11.9. Tomar 20 g de muestra en un matraz de 50mL, agregar 20mL de agua destilada, cubrir y agitar continuamente por 5 minutos.

11.10. Dejar decantar la suspensión por una hora, de manera que el sólido sedimente, en caso contrario centrifugar o filtrar para separar la fase acuosa.

11.11. Tratar el sobrenadante como una muestra líquida.

11.12. Almacenar el electrodo en el recipiente con la solución de almacenamiento.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El Potencial Redox relativo al electrodo normal de hidrógeno se calcula con la siguiente ecuación:

$$E_{NHE}(mV)=E0+C$$

donde:

E_{NHE}: Potencial oxidación /reducción de la muestra relativa al electrodo Normal de Hidrógeno, siguiendo la convención internacional de signos, en mV.

E0: Potencial leído en la muestra, (mV).

C: Potencial desarrollado por la porción del electrodo de referencia relativa al electrodo Normal de Hidrógeno a la temperatura de la medida, según Tabla 1. Si se realiza la medida a una temperatura intermedia se interpola entre los valores correspondientes.

Temperatura ºC	Potencial del electrodo de referencia C (mV)	
	Solución 90-00-01	Solución 90-00-11
10	251	211
15	-	207
20	244	202
25	241	198
30	238	194

Tabla 1.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No corresponde.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ISO 11271:2002 (E) Soil quality- Determination of redox potencial –Field method.

14.2. EPA Method 3060 A-7 ALKALINE DIGESTION FOR HEXAVALENT CHROMIUM.

14.3. EPA Method 9045D-2 SOIL AND WASTE Ph.

14.4. Manual del electrodo. ORION-Platinum redox electrode, model 96-78.

14.5. Instrucciones de uso para electrodo Oakton WD-35805-13.

1050UY

Determinación de humedad en muestras sólidas

(residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos)

Método termogravimétrico

Elaborado - M. Capandeguy

Modificado - C. Gentilini

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso equipos balanza de humedad FQ 553 (INE 113).

2.6. Ruta de análisis (RFQ 36).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

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

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Utilizar lentes, guantes y túnica para el manejo de las muestras.

4.2. En muestras de residuos sólidos, se deberá trabajar en campana de extracción.

5. INTERFERENCIAS

5.1 Durante el almacenamiento las muestras pueden sufrir alteraciones (absorción o liberación de agua, de dióxido de carbono y de diversas sustancias). También puede interferir en la determinación de la humedad la presencia de sustancias volátiles.

5.2. La absorción de la radiación infrarroja depende del color de la superficie por lo tanto, una muestra con distribución irregular de color puede provocar un calentamiento diferencial de la muestra, interfiriendo así en la temperatura de secado. Esto se puede solucionar cubriendo la muestra con un filtro de fibra de vidrio. También es recomendable cubrir la muestra con un filtro de fibra de vidrio cuando la muestra es oleosa, ya que se puede formar una costra que no permita evaporar el agua.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

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

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de humedad (INE 113) (Shimadzu MOC63u).

7.2. Platillo descartable de aluminio para balanza de humedad.

7.3. Espátula.

7.4. Filtro de fibra de vidrio (Catalogo Mettler Toledo #214464 o de similares características).

7.5. Opcional: Estufa de secado a 105 °C y balanza de resolución 0,001 g.

8. REACTIVOS

8.1. No aplica

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

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

Utilizando balanza de humedad:

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

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

11.3. Se recomienda usar entre 10-15 g de muestra excepto para muestras con bajo contenido de humedad, para las cuales se recomienda usar 20-30 g. Considerar también que la cantidad de muestra debe de ser la suficiente para cubrir uniformemente toda la superficie del platillo.

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

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

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

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

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

Utilizando estufa de secado y balanza de resolución 1 mg.

11.5. Cuando no se cuenta con una balanza de humedad o cuando la cantidad de muestras a analizar es muy grande, se utiliza una estufa de secado. Para eso se deben seguir los pasos dos y tres de este procedimiento (Análisis de muestra 11.2 y 11.3) y se registra el peso inicial de la muestra (W). Se coloca la muestra en una estufa de secado a 105 °C (o 50 °C en el caso de muestras con alto contenido de materia orgánica) hasta peso constante; este se define como la diferencia de peso menor a 0,5 % (m/m) para dos pesadas consecutivas con una hora de diferencia. Este peso constante se registra como peso final (D).

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

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

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

donde:

W: corresponde a masa húmeda, inicial

D: corresponde a masa seca, final

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

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

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

1060UY

Determinación de CDOM (materia orgánica disuelta coloreada) por color verdadero usando método óptico

Método espectrofotométrico

Elaborado - N. Bado

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica espectrofotométrica es utilizada para la determinación de CDOM (colored dissolved organic matter) como color verdadero en aguas naturales filtradas. El rango lineal es de aproximadamente 15 mg Pt/L a 450 mg Pt/L, correspondientes a un coeficiente de absorción espectral α (436 nm) de 0,31 a 10,11 m^{-1} y α (458 nm) de 0,42 a 12,17 m^{-1} para las condiciones de trabajo con celdas de 50 mm de camino óptico. El límite de detección es de aproximadamente 5 mg Pt/L correspondiente a un α (436 nm) de 0,09 m-1 y α (458 nm) de 0,15 m^{-1}.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivo de uso de Balanza (INE 94).
2.6. Instructivo de pH-metro (INE 98).
2.7. Instructivo bombas de vacío (INE 01, INE 02).
2.8. Instructivo espectrofotómetro (INE 146).
2.9. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 82, INE 109, INE 121).
2.10. Ruta de análisis (RFQ 51).
2.11. Registro de preparación de solución control (RPS 24).
2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La materia orgánica disuelta coloreada (CDOM) absorbe la luz visible, UV-A y UV-B del espectro electromagnético, principalmente debido a que contiene múltiples enlaces dobles de carbono. Por esta razón, CDOM es considerada como la fracción principal de la materia orgánica disuelta, que absorbe la luz en los ambientes acuáticos. CDOM es el componente medible ópticamente de la materia orgánica disuelta en agua, también conocida como materia orgánica disuelta cromofórica, “gelbstoff” o sustancias húmicas, y se define como la materia orgánica que pasa a través de filtros de tamaño de poro nominal de 0,45 µm.

3.2. El color de las aguas superficiales y subterráneas resulta primariamente de la presencia de materia orgánica natural, particularmente de la materia húmica acuática. La caracterización de la intensidad de color de una muestra de agua se realiza mediante la medida de absorción de la luz. Los diferentes colores generan un máximo de absorción a diferentes longitudes de onda de la radiación incidente.

3.3. El color del agua es determinado usando un espectrofotómetro a una longitud de onda en el rango del espectro visible. Siempre se debe usar λ= 436 nm para aguas naturales; pueden realizarse medidas complementarias a longitudes de onda cercanas al máximo de absorción, el cual es determinado realizando una medida de espectro en un espectrofotómetro de barrido aplicable al rango visible.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, lentes de seguridad y guantes.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La muestra de agua es filtrada previo a su medición, para evitar las interferencias de la materia orgánica no disuelta. Sin embargo, esta filtración puede provocar más interferencias (por ejemplo, debido a reacciones de oxidación provocadas por el contacto con el aire o debido a las precipitaciones iniciadas por la etapa de filtración). Como un ejemplo, compuestos de hierro y manganeso pueden ser retenidos en el filtro o transferidos a un estado de oxidación coloreado.

5.2. En algunos casos no es posible obtener un filtrado claro, particularmente en presencia de sólidos coloidales. Cuando esto sucede se debe mencionar en el reporte la presencia de sólidos coloidales.

5.3. El pH influye sobre el color de las muestras, por este motivo se debe informar en el reporte de resultados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 250 mL de muestra filtrada, sin cámara de aire, en recipientes limpios de vidrio color ámbar, enjuagados con HCl 1+1. Realizar la determinación de color dentro de las 24 h de extraída la muestra, debido a que los cambios biológicos o físicos que ocurren durante el almacenamiento pueden cambiar el color. Con aguas naturales coloreadas, estos cambios llevan a resultados pobres.

6.2. Si no es posible realizar el análisis dentro de las 24 h, se puede almacenar hasta por 5 días en la oscuridad a 4 ± 2 ˚C y llevarlas a temperatura ambiente antes de medir. Prevenir la aireación de la muestra durante su almacenamiento, especialmente en muestras donde puede ocurrir el cambio de color debido a reacciones redox.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro aplicable al rango visible del espectro, con ancho de banda ≤ 10 nm.

7.2. Celda de vidrio de 50 mm de camino óptico.

7.3. pH- metro y electrodo de pH.

7.4. Balanza de resolución 0,01 g.

7.5. Matraces aforados de 500 y 1000 mL.

7.6. Erlenmeyer de 50 mL.

7.7. Pipetas automáticas de volumen variable 0,1-10 mL.

7.8. Filtros de membrana de fibra de vidrio de 0,45 µm de diámetro de poro de 47 mm de diámetro o según corresponda al equipo de filtración.

7.9. Equipo de filtración: bomba de vacío, kitasato para trampa de agua, recipiente recolector de filtrado, soporte de filtro.

8. REACTIVOS

8.1 Agua desionizada (según ES 01).

8.2 Cloroplatinato de potasio (K_2PtCl_6 Nro. CAS 16921-30-5).

8.3 Cloruro de cobalto ($CoCl_2.6H_2O$ Nro. CAS 7391-13-1).

8.4 Ácido clorhídrico concentrado (HCl cc Nro. CAS 7647-01-0).

8.5 Ácido húmico.

8.6 Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$ Nro. CAS 144-55-8).

8.7 Dependiendo de la disponibilidad de reactivos, es posible preparar la “solución Control de CDOM” como se describe en a) o b):

a) Solución estándar control de CDOM de aproximadamente 3000 mg Pt/L: Mezclar 4,2 g de $NaHCO_3$ y 92 mg de ácido húmico en un matraz aforado de 500 mL. Añadir 50 mL de agua desionizada y agitar vigorosamente por algunos minutos hasta disolución. Agregar agua hasta el aforo. Filtrar si es necesario. Almacenar la solución en la oscuridad a 4 ± 2 ˚C en botella de vidrio. Esta solución es estable por 3 meses.

b) Solución estándar control de CDOM de aproximadamente 500 mg Pt/L: disolver 1,246 g de cloroplatinato de potasio (equivalente a 500 mg de platino metálico) y 1,00 g de cristales de cloruro de cobalto en agua desionizada con 100 mL de HCl concentrado y diluir a 1000 mL con agua desionizada. Asimismo, se pueden emplear soluciones comerciales de esta concentración, las cuales pueden ser empleadas como estándar primario.

Realizar las diluciones pertinentes para obtener una solución Control de CDOM que se encuentre con una concentración aproximada a la de las muestras.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Permitir que las muestras alcancen temperatura ambiente.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La curva de calibración se realiza durante la validación, utilizando soluciones de concentración en el rango de trabajo (entre 15 y 450mgPt/L).

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Filtrar la muestra con filtro de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro.

11.2. Medir el pH de la muestra filtrada.

11.3. En caso de ser necesario la muestra puede ser diluida con un volumen conocido de agua desionizada, luego del filtrado.

11.4. Transferir la muestra a la celda óptica. La celda de referencia lleva agua desionizada.

11.5. Si el coeficiente de absorción espectral, α, a la longitud de onda, λ, es menor a 0,1 cm^{-1}, el camino óptico de la celda debe ser de 10 mm o mayor.

11.6. Medir las aguas naturales a 436 nm contra el blanco de agua desionizada.

11.7. Si se desea, realizar mediciones adicionales a un λ donde se encuentre el máximo de absorción (458 nm). En este caso, reportar como observaciones en el informe de resultados.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el coeficiente de absorción espectral, α(λ), en absorbancia por metro, usando la siguiente ecuación:

$$\alpha(\lambda) = \frac{A}{d} f$$

Donde:

A la absorbancia de la muestra de agua a λ

d el camino óptico de la celda en milímetros

f un factor para expresar el coeficiente de absorción espectral en metros^{-1}(f=1000)

El volumen de agua usado para realizar diluciones se debe tener en cuenta al expresar los resultados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de veracidad:** Analizar una dilución de la solución de “Control de CDOM” (8.7), que posea una concentración cercana a la de las muestras, simultáneamente con las mismas. Se compara el resultado con su valor de referencia (interpolando en la curva de calibración vigente). Se acepta el resultado cuando se encuentre del rango 85-115% hasta contar con el gráfico de control correspondiente.

13.2. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada cinco muestras y por lo menos uno por serie, e informar el promedio de ambos valores. El criterio de aceptación es de 5% hasta contar con el gráfico de control correspondiente.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ISO 7887: 2011 (en) Water quality – Examination and determination of color. Method B: Determination of the true colour using optical instruments, pp 3 to 5.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 2120 A. Color Introduction, pp 81 -82.

14.3. Revista de la Facultad de Ciencias, Rev. Fac. Cienc. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín V 7 N◦1 (enero-junio de 2018). ISSN-e 2357-5749. Artículo Investigación "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE COLOR REAL EN AGUA" M. Martínez, A. Osorio. Páginas 143 a 155 DOI: https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v7n1.680.

14.4. "Investigation of Colored Dissolved Organic Matter and Dissolved Organic Carbon Using Combination of Ocean Color Data and Numerical Model in the Northern Gulf of Mexico" (2012). LSU Master's Theses. 249. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/249.

1073UY

Determinación de material particulado en matriz aire por filtración forzada

Método gravimétrico a partir de muestreadores de alto volumen

Elaborado - F. Lauber

Modificado - V. Muñoz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Tablas de relación Temperatura – (Po/Pa) correspondiente al equipo empleado (Flow Look-Up Table High volume sampler).

2.6. Instructivo de pesada de filtros (INE 56).

2.7. Instructivo para calibración de la balanza (INE 55).

2.8. Ruta de análisis para la determinación de material particulado en aire (RFQ 19).

2.9. Ruta de análisis para material de aire (RAD 04).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El aire a muestrear es conducido por los muestreadores de alto volumen a través de un filtro de fibra de vidrio o de fibra de cuarzo, de manera que el material particulado suspendido sea colectado en la superficie del filtro, con un mínimo de eficiencia de colección de 99 % para partículas de 0,3 µm de diámetro.

3.2. La geometría de la tapa protectora del colector y la velocidad del flujo de aire favorece la colección de partículas menores de 100 µm de diámetro (PTS) y con el dispositivo selector de tamaño se colectan preferentemente partículas menores a 10 µm de diámetro (PM10).

3.3. Los filtros son pesados antes y después de la exposición para la determinación de la ganancia en peso. El volumen de aire muestreado se determina con la velocidad de flujo y el tiempo de muestreo. La concentración de partículas en el aire es calculada como la masa de material colectado en el filtro sobre el volumen de aire muestreado.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

5. INTERFERENCIAS

5.1. En el muestreo:

a. Grandes objetos, tales como insectos, que puedan ser depositados sobre el filtro.

b. Aerosoles líquidos, tales como niebla de aceites o gotas de neblina son retenidos en el filtro. Si la cantidad de líquido colectado es apreciable, el filtro puede quedar húmedo y este valor no ser representativo.

c. Algunos gases o vapores constituyentes de la atmósfera muestreada que reaccionan o son absorbidos sobre el filtro podrían ser retenidos.

d. El dióxido de azufre (SO_2) y los óxidos de nitrógeno (NOX) atmosférico pueden interferir por la formación de artefactos debidos a la retención de SO_2 en forma de sulfato (SO_4^{-2}) en filtros alcalinos. Para el uso de filtros de fibra de vidrio en condiciones normales un error de 0,3-3,0 µg/m^3 puede ser esperado, en condiciones extremas el error puede ser mayor.

e. Cuando el filtro se carga con el material colectado, la velocidad de muestreo puede ser reducida. Si ocurre una caída significativa en la velocidad del flujo de aire, el promedio del flujo inicial y final no dará una estimación exacta de este, durante el período de muestreo. La magnitud de tales errores dependerá del porcentaje de reducción de la velocidad del flujo de aire y de la variación de concentración de masa de polvo dentro del las 24 horas que involucra el período de muestreo. Una guía aproximada, cualquier muestra

debería ser sospechosa de error si la velocidad de flujo final es menos que ½ de la velocidad inicial. Esto se verifica a través de los datos de presión inicial y final leídas en el manómetro que posee el equipo. La mayor exactitud en la medida de la velocidad de flujo de aire se alcanza cuando se utilizan equipos con mecanismos de control que mantienen constante el flujo de aire durante el período de muestreo. Otro procedimiento posible para evitar el error introducido por las variaciones de la velocidad del flujo de aire, en equipos sin dispositivos de control, es usar un dispositivo que registre la velocidad del flujo durante todo el período de muestreo e integrar los valores en función del tiempo, o realizar una medida exacta del volumen total de aire muestreado.

f. Fallas de poder o cambios de voltaje durante el período de muestreo llevarían a un error, dependiendo de la extensión y tiempo de duración de tal falla.

g. El depósito pasivo sobre el filtro dejado en el equipo antes o después del período de muestreo puede introducir errores. El tiempo de instalación y remoción del filtro debe ser prudente o deben utilizarse muestreadores con obturadores.

h. Si dos o más muestreadores son utilizados en un mismo lugar, deberían estar ubicados al menos a dos metros de distancia uno del otro, de manera de no alterar resultados de muestreadores adyacentes.

i. En atmósferas conteniendo altas concentraciones de partículas de gran tamaño pueden existir errores significativos en función de la orientación del viento respecto al muestreador.

j. Polvo metálico de motores, especialmente cobre, pueden ser contaminantes bajo algunas condiciones.

k. Pérdida de partículas post muestreo.

l. Errores en el timer. Debido a interrupciones en la fuente de poder durante el muestreo, o a discrepancias entre los tiempos de inicio y fin registrados y los valores reales, tales diferencias pueden ser causadas por pobre resolución del timer, error del mismo por fallas en la fuente de energía o mal funcionamiento

m. Recirculación de aire ya muestreado. Bajo condiciones de viento estancado, los muestreadores pueden remuestrear el aire. Este efecto es poco significativo para la determinación de PTS pero incrementa los resultados de determinación de cobre y carbón.

5.2. En el análisis:

a. Si las partículas colectadas en el filtro son higroscópicas, el control de humedad que realiza el dispositivo de secado puede ser insuficiente, resultando en más el valor del peso final.

b. Pérdida de volátiles. Las partículas volátiles colectadas en el filtro podrían perderse durante el propio muestreo, o en los procedimientos y/o almacenaje de los filtros antes de la pesada post muestreo. Para minimizar la perdida post muestreo el filtro es doblado a la mitad, con el material colectado hacia adentro, y luego colocado en el sobre de nylon original.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Colocar tanto el filtro en el equipo, como el disco para registro del equipo: DICKSON Gráficos de 10,2 cm de diámetro o similar y programar el equipo para un muestreo activo durante 24 horas. Medir la presión en el manómetro del equipo al comienzo y al final de la operación. Completar la Planilla de Registro del filtro correspondiente. La muestra típica es un filtro por punto de muestreo.

6.2. Luego del muestreo, doblar el filtro con el material particulado hacia adentro, colocando el papel dentro del sobre de nylon correspondiente. Mantener a temperatura ambiente.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,0001 g (Sartorius LA 130 SF o similar)

7.2. Filtros para determinación de Material Particulado (PTS): filtros de microfibra de cuarzo, WHATMAN tamaño 20,3 cm x 25,4 cm catálogo número 1851 865 o similar.

7.3. Filtros para la determinación de Material particulado menor a 10 micras: GRASEBY GMW P/N – G810, tamaño 20,3 cm x 25,4 cm o similar.

7.4. Filtros para la determinación de PTS o PM 10: microfibra de vidrio de alta pureza, EPM 2000, tamaño 8 in x 10 in o similar.

7.5. Dispositivo para alojar filtros bajo humedad controlada.

7.6. Sobres de nylon para filtros.

7.7. Etiquetas para identificar los sobres de nylon.

7.8. Sobres de papel tamaño apto para guardar las series de filtros que se envían para muestreo.

7.9. Higrómetro de resolución al 1 %.

8. REACTIVOS

8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. El equipo de muestreo es calibrado por el solicitante.

10.2. La balanza donde se realizan las pesadas debe ser calibrada cada vez que se enciende según instructivo.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación de los filtros previa al muestreo.

11.1. Colocar los filtros nuevos sin doblar, en el dispositivo de secado, cada uno en un estante diferente durante 24 horas (humedad controlada entre 40 y 45 %).

11.2. Pesar los filtros, en la balanza previamente calibrada, según instructivos.

11.3. Registrar en la planilla correspondiente (RFQ 19) número y peso inicial del filtro.

11.4. Colocar el filtro en un sobre de nylon. Etiquetar el sobre indicando número y tipo de filtro, y peso inicial.

11.5. Preparar grupos de 10 filtros y guardarlos en un sobre de papel adecuado rotulado indicando: tipo de filtro, números de los filtros, y número de sobre.

Agregar además 10 discos de control de equipo.

11.6. Registrar el número de filtro en el formato RAD 04 Ruta de análisis para material de aire, donde se asigna el número de sobre.

Tratamiento de filtros usados

11.7. Registrar el ingreso de la muestra recibida y asignarle un número de análisis. El filtro debe llegar al laboratorio doblado a la mitad con el material colectado hacia adentro y dentro de su sobre de nylon original, acompañado con los datos de campo y el formato para Registro de Ingreso de Muestras de Filtros de Aire (RIG 12). En los sitios que cuentan con equipos para el muestreo de PTS y PM10 los equipos de PTS no cuentan con contador, se utilizan entonces los valores del equipo de PM10.

11.8. Colocar el filtro usado doblado como llegó al laboratorio en el dispositivo de secado, mínimo 24 horas, con el fin de estandarizar su humedad (humedad controlada 40 –45 %).

11.9. Pesar el filtro doblado según instructivo de pesada de filtros y devolverlo al sobre original.

11.10. Registrar el peso final en la planilla correspondiente (RFQ 19).

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

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

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

donde:

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

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

106: corresponde al factor de conversión de gramos a microgramos

60: corresponde al factor de conversión de horas a minutos

QSTD: corresponde al caudal en condiciones estándar

QSTD se calcula de la siguiente forma:

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

donde:

Q_a es el caudal calculado a partir de la relación de presiones P_o/P_a y la temperatura en ese día (T_a en °C).
Para cada equipo existe una tabla con las correspondientes relaciones y caudales.

Po/Pa está dada por la ecuación:

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

donde:

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

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

P_a: corresponde a la conversión de Hectopascales a mmHg =($P_{(HP)}$/1012,25 x 760) =P(mmHg)

12.2. Las condiciones que deben cumplirse para el cálculo de PTS y P_M10 son las siguientes:

- El tiempo de exposición debe estar dentro del rango 24,0 ± 3,6 h.
- La diferencia de peso en los filtros debe ser mayor que el LD calculado para cada tipo de filtro: 0,0005 g para PTS y 0,0009 g para PM10.
- La relación P_o /P_a debe ser menor que 0,979 de acuerdo a las tablas proporcionadas por los equipos, en caso de caer fuera de tabla, estimar con el punto máximo de la tabla, informando un valor estimado.
- Q_{std} debe estar entre 1,1 -1,7 m^3/min para PTS y entre 1,017-1,243 m^3/min para P_M10.
- Límite de cuantificación : PTS: 2,5 µg/m^3
  PM10: 4,0 µg/m^3

Se informa con 2 cifras significativas.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Debido a las características del muestreo, no es posible realizar análisis de exactitud y precisión.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA - Compendium Method IO 2.1 – Sampling of ambient air for Total Suspended Particulate Matter (SPM) and PM10 using High Volume (HV) Sampler.

14.2. EPA - Reference Method for the Determination of Suspended Particulate Matter in the Atmosphere (High – Volume Method), Title 40, chapter I, part 50 appendix B, pp 25-35.

14.3. Ambient Air Quality Surveillance, Title 40, chapter I, part 58.

1075UY

Determinación de la distribución granulométrica

Método de tamizado

Elaborado - A. Feo

Modificado - NC

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Este procedimiento aplica a la determinación cuantitativa del porcentaje de limos y arcillas (fracción fina) contenido en muestras de suelos y sedimentos, utilizando el método de tamizado.

La fracción fina es la constituida por partículas tales que pasan por un tamiz de 0,050 mm. de apertura.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento 1050UY Determinación de Humedad.

2.6. Instructivo de uso de Tamizadora IN 703 (INE 152).

2.7. Instructivo para calibración de la balanza (INE 55).

2.8. Ruta de análisis para la determinación de la Distribución Granulométrica (RFQ 57).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La distribución granulométrica de las partículas es una de las características físicas más importantes de un suelo; la clasificación de suelos se basa, principalmente, en esta característica. Muchas de las propiedades geotécnicas e hidrogeológicas se relacionan con dicha distribución.

3.2. La caracterización de los suelos aporta una descripción basada en una subdivisión en clases discretas de tamaños de partículas. El tamaño de cada clase se puede determinar por tamizado y/o sedimentación.

3.3. El método de tamizado implica la utilización de una serie de tamices con diferentes aberturas para separar las partículas de suelo según su tamaño.

3.4. En este ensayo se va a determinar el porcentaje de finos que corresponde a limos y arcilla contenidos en la muestra, por lo que se van a utilizar los tamices de 0,050 mm y de 2,0 mm para retener el material más grueso y así evitar la sobrecarga del tamiz de menor abertura.

3.5. El ensayo de tamizado se realiza siempre sobre la muestra seca, aunque la muestra de partida pueda estar húmeda.

3.6. Es importante verificar antes de cada ensayo las condiciones del tamizado: tiempo y amplitud.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar elementos de protección personal: túnica, guantes y lentes.

4.2. El Equipo utilizado opera con vibraciones intensas y continuas por lo que debe estar sobre una superficie firme, que asegure su estabilidad y en la que no interfiera con otros equipos, que puedan verse afectados.

4.3. Se debe tener la precaución de no tocar cuando esté en funcionamiento, ya que puede causar golpes al analista.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La presencia de elementos que no representen partículas del suelo (material vegetal u otros materiales orgánicos y cualquier otro material), piedras de tamaño grande o suelo aglomerado, pueden dificultar el tamizado, disminuyendo la eficiencia del proceso.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar aproximadamente 500 g de muestra en bolsa plástica.

6.2. Analizar antes de los 90 días de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Agitador mecánico de tamices

7.2. Tamices de alambre con marco metálico, abertura cuadrada, con aberturas nominales de: 0,050 mm y 2,0 mm

7.3. Bandeja receptora para el tamiz de menor abertura/ tapa para el tamiz de mayor abertura.

7.4. Balanza de precisión 0,1g

7.5. Estufa de secado para ser empleada a 110 °C + 5 °C

7.6. Desecador con sílica gel con indicador

7.7. Recipientes para secado de muestras de ensayo (resistentes a la corrosión, tipo placas de vidrio o vidrios reloj) de 15 a 20 cm de diámetro y 1,5 a 2,0 cm de altura (aprox.)

7.8. Cepillo para limpieza de tamices

7.9. Cuarteador- bandejas para cuarteo

7.10. Espátula o cuchara

7.11. Bolsas para utilizar al manipular la muestra seca

8. REACTIVOS

8.1. No aplica.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Las matrices ambientales que se tratan en este procedimiento son complejas y heterogéneas, por lo que debe realizarse como etapa preliminar del análisis una toma de muestra mediante cuarteo, de manera tal de obtener una muestra de ensayo representativa.

La eficacia del tamizado mecánico depende del tipo de muestra, del tiempo de tamizado, de la carga sobre el tamiz y de los parámetros del movimiento de agitación, tales como amplitud y frecuencia.

El agitador mecánico de tamices debe operarse durante 10 min., con una amplitud de 1,0 mm.

El tamizado se considera completo cuando una agitación adicional durante 1 min, no produce un cambio de masa en el material retenido sobre cualquiera de los tamices utilizados de más de 1% de la masa retenida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Disponer el total de la muestra en una bandeja y homogeneizar cuidadosamente, con espátula o cuchara. Luego reducir por cuarteo, para obtener, cuando esté seca, una cantidad de material de 100 g como mínimo. Considerar el dato de humedad de la muestra.

11.2. Secar la muestra a ensayar en estufa a 110 °C, hasta peso constante.

11.3. Una vez seca la muestra, se realiza una limpieza manual, eliminando todo el material que no sea partículas del suelo; colocar en una bolsa adecuada y deshacer los aglomerados presentes.

11.4. Se determina la masa de la muestra seca (M) con una precisión de 0,1 g o 0,1 % de la masa, eligiendo el valor mayor de ambos. Registrar en el RFQ 57.

11.5. Pesar la bandeja receptora ($P_{b\,i}$) y los tamices ($P_{0.050\,i}$ y $P_{2,0\,i}$) y registrar en el RFQ 57.

11.6. Realizar el tamizado de la muestra utilizando el agitador mecánico, colocando los dos tamices a utilizar, ubicados desde el de mayor al de menor abertura, en orden descendente, colocando bajo el tamiz inferior la bandeja receptora y sobre el tamiz superior, la muestra y la tapa.

Verificar las condiciones del tamizado:

Tiempo= 10 min

Amplitud=1,0 mm

Operar el equipo según el INE 152.

Cumplidos los 10 minutos, pesar la bandeja con la muestra recogida. Colocarla nuevamente en su lugar y agitar durante 1 min, verificando que la masa no sufra una variación de más del 1%, entre las dos pesadas. Si esto ocurre, repetir la operación durante 1 min las veces necesarias hasta que la variación sea inferior al 1%.

11.7. Pesar la bandeja receptora ($P_{b\,f}$) y los dos tamices utilizados ($P_{0.050\,f}$ y $P_{2,0\,f}$) con el material recogido en ellos.

11.8. Se realiza la suma del material retenido en los dos tamices y en la bandeja receptora. Si este valor difiere en más de el 1% de la masa inicial (M), se debe repetir el ensayo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1.

$$f0{,}050 = \frac{\mathrm{Pb\,f} - \mathrm{Pb\,i}}{M} \times 100$$

$f_{0.050}$ = fracción que pasa por el tamiz de 0.050 mm (%)

$P_{b\,f}$ = masa de suelo que pasa tamiz de 0,050mm + masa bandeja receptora

$P_{b\,i}$ = masa de la bandeja receptora

M = masa seca total de la muestra de suelo inicial (g)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. UNE-EN ISO 17892-4:2016 Investigación y ensayos geotécnicos. Ensayos de laboratorio de suelos. Parte 4: Determinación de la distribución granulométrica.

14.2. Soil Survey Manual (USDA) United States Department of Agriculture Handbook No. 18 - marzo 2017.

14.3. Manual de Operación Tamizadora Vibratoria POWTEQ SS2000- Beijing Grinder Instrument Co.Ltd.

SECCIÓN 2
Orgánicos Generales

2001UY

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

Método gravimétrico, con extracción por Soxhlet

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - A. Feo

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

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

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

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos –Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivo de uso de equipo Soxhlet y planchas calefactoras (INE 31 e INE 70).
2.6. Instructivo de uso de la bomba de vacío (INE 02).
2.7. Instructivo de uso del destilador (INE 36).
2.8. Instructivo de uso del desionizador (INE 121).
2.9. Instructivo de uso de chiller (INE 144).
2.10. Instructivo de uso de rotavapor (INE 114).
2.11. Instructivo de uso de balanza (INE 94).
2.12. Instructivo de uso de balanza (INE 16 A o B).
2.13. Ruta de análisis (RFQ 01).
2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Aceites y grasas se considera cualquier material recuperado de la muestra acidificada, como una sustancia soluble en hexano y no volatilizable durante el ensayo. Incluye además de aceites y grasas, otros materiales extraíbles por el solvente.

3.2. Los aceites y grasas quedan definidos por el método de análisis utilizado.

3.3. Los aceites y las grasas viscosas presentes, así como los sólidos, son separados por filtración de la muestra líquida acidificada, mientras que los jabones metálicos son hidrolizados por la acidificación. Los aceites y grasas que quedan retenidos en el filtro, se extraen con hexano en un equipo Soxhlet, durante 4 horas con una frecuencia de reflujo de 20 ciclos por hora. La ganancia de peso en el frasco de extracción luego de evaporado el solvente corresponde al contenido de aceites y grasas presentes en la muestra.

3.4. El tiempo y la velocidad de extracción son puntos críticos en la determinación.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El hexano es volátil e inflamable por lo que se debe tener especial cuidado en la manipulación, evitar derrames y trabajar dentro de la campana de extracción.

4.2. Debido a la toxicidad inherente del hexano, evitar contacto directo e inhalación por parte del operario, utilizar túnica; lentes de seguridad y máscara con filtro para solventes orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/organic vapor cartridge o similar).

4.3. Evitar pérdidas en las mangueras de agua del refrigerante del equipo Soxhlet, para no dañar las planchas y evitar entrada de agua en los balones.

4.4. Asegurar que el equipo posea el aislamiento adecuado para evitar incendios frente a posibles derrames de solvente o agua sobre las planchas calefactoras.

5. INTERFERENCIAS

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

5.2. Todo material de origen orgánico como insectos, hojas pude falsear el resultado. Retirarlos previo a la determinación.

5.3. La remoción de solvente resulta en la pérdida de hidrocarburos de cadenas cortas y aromáticos simples por volatilización.

5.4. Cumplir con el tiempo de secado definido, de lo contrario se corre el riesgo de tener pérdida en el peso debido a volatilización.

5.5. Durante la etapa de enfriamiento se debe usar desecador, para evitar incremento en el peso debido a higroscopicidad.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La preparación de los materiales a ser empleados se realiza de acuerdo al Manual de Gestión de Calidad; Procedimiento 16 “Limpieza de materiales” (PR 16): lavar el frasco de vidrio de boca ancha en termodesinfectadora, secar y finalizar con un último enjuague con hexano.

6.2. Recolectar aproximadamente 1000 mL de muestra en un frasco de vidrio de boca ancha.

6.3. Acidificar a pH < 2 con HCl (1 + 1) o H_2SO_4 (1 + 1) en el mismo recipiente en el cual fue extraída la muestra en el momento del muestreo, para evitar degradación si el análisis no puede ser realizado dentro de las 2 horas de extracción de la muestra.

Refrigerar a ≤6 °C (>0 °C). Analizar antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de extracción Soxhlet compuesto por balón de extracción de 300 mL de fondo chato, embudo Soxhlet y refrigerante.

7.2. Equipo de filtración compuesto por bomba de vacío, embudo Buchner de 11 cm de diámetro, Kitasato recolector de filtrado y trampa de agua.

7.3. Plancha calefactora.

7.4. Pinza: una de más de 10 cm de largo metálica y otra con punta chata para tomar los cartuchos y el filtro, respectivamente.

7.5. Cono de extracción de celulosa tipo Whatman 30 mm x 80 mm (D x h) o similar de acuerdo al tamaño del componente de extracción perteneciente al equipo.

7.6. Papel de filtro de 11 cm de diámetro, Whatman N° 40 o equivalente.

7.7. Piedras porosas, de ebullición y/o cerámicas.

7.8. Probeta de 1000 y 500 mL de vidrio o de plástico, vaso de Bohemia de 250 mL de vidrio.

7.9. Balanza de resolución 0,1 mg.

7.10. Balanza de plato abierto de resolución 0,01 g.

7.11. Equipo de evaporación de solvente (rotavapor compuesto por baño de agua, ajuste de temperatura variable (entre 60 - 80 °C), condensador, balón recolector de solvente y trampa de agua para vacío y refrigeración del condensador: chiller o equipo similar).

7.12. Baño de hielo.

7.13. Desecador.

7.14. Estufa de secado para ser empleada a 104 + 1°C.

7.15. Vidrio reloj empleado para sostén de los filtros o similar.

7.16. Cápsula de porcelana o material similar donde alojar los cartuchos dentro de la estufa.

7.17. Recipientes para el almacenamiento del hexano ya utilizado.

8. REACTIVOS

8.1. n – Hexano - $CH_3(CH_2)_4CH_3$ N°CAS 110-54-3, 85 % mínima pureza, 99 % mínimo saturado en isómeros C6, residuo menor a 1mg/L; destilar si es necesario.

8.2. Ácido Clorhídrico (HCl N°CAS 7647-01-0) (1+1).

8.3. Ácido Sulfúrico (H_2SO_4 N°CAS 7664-93-9) (dilución 1+1).

8.4. Tierra diatomeas (tipo Super-Cel, Celite o equivalente), en suspensión 1 g/100 mL en agua destilada.

8.5. Agua destilada según ES01.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. El registro de los datos se realiza en la ruta de análisis RFQ 01.

11.2. Numerar y colocar los balones limpios con las piedras de ebullición en un desecador, dejar estabilizar hasta obtener peso constante (24 hs. en desecador), pesar con balanza de precisión 0,1 mg (p1). Realizar dos pesadas o las necesarias hasta que la diferencia entre dos de ellas sea igual o menor a 0,4 mg.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nota 1: Verificar a partir del RCE 45 de la Carpeta de Mantenimiento y Control de Equipos, donde se encuentra registrado el número de posición donde ubicar cada plancha a los efectos de cumplir con los requerimientos de los ciclos.

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

11.13. Evaporar el solvente del balón de extracción en el rotavapor con el baño de agua entre 60 - 80 °C, durante 30 minutos. Cumplido este tiempo, sacar el balón de extracción del rotavapor. Colocar el balón en baño de hielo (shock térmico) para detectar presencia de solvente; si existe condensación del solvente continuar la evaporación.

11.14. Colocar el balón de extracción en un desecador hasta peso constante (ídem 11.2), pesar con precisión de 0,1 mg. (p2).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1.

$$\text{aceites y grasas} \quad \text{mg/L} = \frac{(p_2 - p_1) \times 1000}{V}$$

donde:

p_1: peso del balón de extracción con perlas de ebullición y cerámicas previo a la extracción (mg).

p_2: peso del balón de extracción con perlas de ebullición y cerámicas luego de la extracción (mg).

V: volumen de muestra filtrado en mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud:** Analizar una solución control en cada serie de muestras a los efectos de contar con el porcentaje de recuperación, según lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico; verificar que el mismo se encuentre bajo control estadístico en el gráfico de control.

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

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater , 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023 .Método 5520 A Oil and grease Introduction y 5520 D Soxhlet Extraction Method pp.571 a 572 y pp.575.

14.2. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Method 1664, Revision B: n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry (2010).

2002UY

Determinación de hidrocarburos en aguas naturales y en efluentes líquidos industriales

Tratamiento con sílica gel de grasas y aceites extraídos con hexano

Elaborado – M. Menéndez

Modificado – A. Feo

Revisado – P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado – N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1 Esta norma técnica se utiliza para determinar hidrocarburos en aguas naturales y en efluentes líquidos industriales entre 16 y 200 mg/L. El límite de detección de esta técnica es de 5,4 mg/L.

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos –Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivo de uso de equipo Soxhlet y planchas calefactoras (INE 31 e INE 70).
2.6. Instructivo de uso de la bomba de vacío (INE 02).
2.7. Instructivo de uso del destilador Branstead (INE 36).
2.8. Instructivo de uso del desionizador (INE 121).
2.9. Instructivo de uso de chiller (INE 144).
2.10. Instructivo de uso de rotavapor (INE 114).
2.11. Instructivo de uso de balanza (INE 94).
2.12. Instructivo de uso de balanza (INE 16 A o B).
2.13. Ruta de análisis (RFQ 01).
2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

5. INTERFERENCIAS

5.1. La remoción de solvente resulta en la pérdida de hidrocarburos de cadenas cortas y aromáticas simples por volatilización.
5.2. Cumplir con el tiempo de secado definido, de lo contrario se corre el riesgo de tener pérdida en el peso debido a volatilización.
5.3. La sílica puede generar interferencia positiva si al realizar la filtración pasa hacia el balón.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La preparación de los materiales a ser empleados se realiza de acuerdo al Manual de Gestión de Calidad; Procedimiento 16 “Limpieza de materiales” (PR 16): lavar el frasco de vidrio de boca ancha con detergente, enjuagar con agua de grifo y finalizar con un último enjuague con hexano.

6.2. Recolectar aproximadamente 1000 mL de muestra en un frasco de vidrio de boca ancha.

6.3. Acidificar a pH < 2 con HCl (1+1) o H_2SO_4 (1+1) en el mismo recipiente en el cual fue extraída la muestra en el momento del muestreo para evitar degradación si el análisis no puede ser llevado a cabo dentro de las 2 horas de extracción de la muestra. Refrigerar entre 0 y 6 °C. Analizar antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de extracción Soxhlet compuesto por balón de extracción de 300 mL de fondo chato, embudo Soxhlet y refrigerante.

7.2. Equipo de filtración compuesto por bomba de vacío, embudo Buchner de 11 cm de diámetro, Kitasato recolector de filtrado y trampa de agua.

7.3. Plancha eléctrica de calentamiento para Soxhlet.

7.4. Pinzas: una de más de 10 cm de largo metálica y otra con punta chata para tomar los cartuchos y el filtro, respectivamente.

7.5. Cono de extracción de celulosa tipo Whatman 30 mm x 80 mm (D x h) o similar de acuerdo al tamaño del componente de extracción perteneciente al equipo.

7.6. Papel de filtro de 11 cm de diámetro, Whatman Nº40 o equivalente.

7.7. Piedras porosas, de ebullición y/o cerámicas.

7.8. Probeta de 1000 y 500 mL de vidrio o de plástico, vaso de bohemia de 250 mL de vidrio.

7.9. Balanza de resolución de 0,1 mg.

7.10. Balanza de plato abierto de resolución 0,01 g.

7.11. Equipo de evaporación de solvente (Rotavapor compuesto por baño de agua, ajuste de temperatura variable (entre 60 - 80 °C), condensador, balón recolector de solvente y trampa de agua para vacío y refrigeración del condensador: chiller o equipo similar).

7.12. Baño de hielo.

7.13. Desecador.

7.14. Estufa de secado para ser empleada a 104 + 1°C.

7.15. Vidrio reloj empleado para sostén de los filtros.

7.16. Cápsula de porcelana o material similar donde alojar los cartuchos dentro de la estufa.

7.17. Cápsulas de cerámica donde colocar la sílica para su secado en la estufa.

7.18. Barras magnéticas agitadoras recubiertas con TFE.

7.19. Plancha eléctrica de calentamiento con agitador.

7.20. Embudos de vidrio para filtración.

7.21. Pipeta aforada de volumen necesario según cálculo en 11.3

8. REACTIVOS

8.1. n – Hexano [$CH_3(CH_2)4CH_3$ N°. CAS 110-54-3] 85 % mínima pureza, 99 % mínimo saturado en isómeros C6, residuo menor a 1 mg/L; destilar si es necesario.

8.2. Ácido clorhídrico (HCl N°. CAS 7647-01-0) (1+1).

8.3. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 N°. CAS 7664-93-9) (1+1).

8.4. Sílica gel, 100 a 200 mesh. Secar a 110 °C por 24 h y almacenar en contenedor herméticamente cerrado.

8.5. Agua desionizada según ES 01.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Utilizar el procedimiento 2001UY para la determinación de aceites y grasas en las muestras y registrar en el RFQ 01. Reservar estos balones en un desecador. Colocar la cantidad necesaria de balones vacíos, para la determinación de hidrocarburos en otro desecador con la misma numeración que los anteriores.

Dejar estabilizar hasta obtener peso constante (24 hs en desecador. Se puede realizar vacío dentro de los desecadores para llegar más rápido al peso constante).

Pesar con balanza de precisión 0,1 mg (p3). Realizar dos pesadas o las necesarias hasta que la diferencia entre ellas sea igual o menor a 0,4 mg. Registrar el peso en RFQ 01.

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

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

- Dilución primaria: transferir las grasas y aceites redisueltas en el punto 11.2 a un matraz aforado de 100 mL. Completar con hexano. Calcular el volumen que contiene 1000 mg de grasas y aceites según la siguiente ecuación:

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

donde:

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

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

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

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

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

donde:

FD: corresponde a Factor de Dilución

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

11.5. Filtrar la solución con un papel de filtro pre-humedecido con hexano a los balones de extracción pesados en el punto 11.1. Enjuagar la sílica gel y el papel de filtro con 10 mL de hexano (para asegurar que todos los hidrocarburos pasaron a través del papel de filtro).

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

11.7. Colocar el balón de extracción en un desecador hasta peso constante, pesar con precisión de 0,1 mg. (p4). Ídem 11.1.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1.

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

donde:

p_3: corresponde a peso inicial del balón, vacío (mg)

p_4: corresponde a peso final del balón, luego de evaporación de solvente (mg)

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

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud:** Analizar una solución control en cada serie de muestras a los efectos de contar con el porcentaje de recuperación, según lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico; verificar que el mismo se encuentre bajo control estadístico en el gráfico de control.

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

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Método 5520 F Hydrocarbons pp.576 a 577.

14.2. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water, Method 1664, Revision B: n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry (2010).

2005UY

Determinación del contenido de materia orgánica (MO) y carbono orgánico total (TOC) en suelos y sedimentos

Elaborado - Luciana Pereira

Modificado - C. Grau / M.Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Se determina el contenido estimado de materia orgánica por el método Loss on Ignition.

1.2. A partir del resultado de materia orgánica obtenida, utilizando el factor de “Van Bemmelen” (1.724), establecido en Soil Survey Laboratory Method Manual, se obtiene el valor estimado de Carbono Orgánico Total (TOC).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental de DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental de DINACEA.

2.3. Manual de control de calidad analítico - Laboratorio Ambiental de DINACEA.

2.4. Instructivo de uso de la estufa a 110 °C (INE 107).

2.5. Instructivo de uso de la mufla a 400 °C (INE 27).

2.6. Instructivo de uso de la balanza de plato abierto de resolución (INE 115).

2.7. Ruta de análisis (RQF 46).

2.8. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se seca la muestra de suelo húmeda hasta masa constante a 110 °C y se registra su masa. Luego se calienta a 400 °C durante 16 h para eliminar la materia orgánica. La misma se libera de la muestra como CO_2 y causa una diferencia de masa. El contenido mineral de la muestra expresado en porcentaje se calcula como el cociente entre la masa de la muestra luego de la ignición a 400 °C sobre la masa seca a 110 °C multiplicado por 100. El contenido de materia orgánica expresado en porcentaje se calcula como la diferencia 100 - Contenido mineral.

3.2. El valor estimado de Carbono Orgánico Total (TOC) se estima como se indica en 1.2.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se necesita precaución al trabajar con la estufa y la mufla a altas temperaturas. Manipular el material caliente con pinzas.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El secado incompleto de la muestra puede ocasionar sobre estimación del contenido de materia orgánica. Además si en algún caso la mufla supera temperaturas mayores a 440 °C se destruyen también los carbonatos (carbono inorgánico) y el valor informado no corresponderá únicamente al contenido de materia orgánica de la muestra.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Muestrear al menos 100 g de suelo o sedimento tomando la muestra de los primeros 15 cm desde la superficie. Asegurar representatividad de la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza electrónica con resolución de al menos 0,01 g.

7.2. Estufa 110 ± 5 °C.

7.3. Cápsulas o crisoles de porcelana

7.4. Mufla 400 °C.

7.5. Espátula

7.6. Desecador provisto de un desecante con un indicador de color

7.7. Pinza de metal para manipular las cápsulas o crisoles.

8. REACTIVOS

8.1. Este procedimiento no requiere el uso de reactivos.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Los crisoles o cápsulas con la muestra deben colocarse en desecadores inmediatamente luego de terminar el tiempo de secado o calentamiento y asegurar que estén a temperatura ambiente antes de registrar su masa. Se debe utilizar cápsulas o crisoles de un tamaño adecuado, de modo que la muestra ocupe aproximadamente la mitad de su volumen, de forma tal que no ocupe todo el recipiente (por riesgo de calentado no homogéneo o de pérdidas de muestra), ni demasiado grandes (por el cambio en masas pequeñas se detecta con mayor dificultad).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Registrar la masa de la cápsula o crisol limpio y seco.

11.2. Colocar entre 10 y 15 g de muestra húmeda en la cápsula o crisol.

11.3. Secar la muestra durante 16 h en estufa a 110 °C.

11.4. Colocar la muestra en desecador y al enfriar registrar la masa.

11.5. Colocar la muestra en la mufla fría y aumentar la temperatura gradualmente hasta 400 °C. Calentar durante 16 h a esa temperatura.

11.6. Colocar la muestra en desecador y al enfriar registrar su masa.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1 Calcular el contenido porcentual de materia orgánica de la siguiente forma:

$$\text{Contenido de materia orgánica (\%)} = 100 - \text{Contenido mineral (\%)}$$

12.2 Se calcula el contenido mineral como:

$$\text{Contenido mineral (\%)} = \frac{Rw}{ODw} \times 100$$

donde:

R_w=Masa del residuo luego de la ignición (después de calentamiento en la mufla)

OD_w = Masa del suelo secado a 110 °C (Oven dry)

12.3. Se calcula el contenido de TOC como:

$$\text{Contenido de TOC (\%)} = \frac{\text{Contenido de materia orgánica (\%)}}{\text{Factor de “Van Bemmelen”}}$$

donde:

Factor de “Van Bemmelen”= 1.724

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Se deben analizar las muestras de sedimentos por duplicado y de suelo por triplicado. Verificar que la dispersión de las réplicas se encuentre dentro de los límites de control. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites se debe proceder según el procedimiento Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de blancos:** Incluir en cada batch el análisis de un blanco, colocando una cápsula vacía. Procesar simultáneamente con las muestras, a los efectos de verificar que al momento del pesado las cápsulas se encuentren a temperatura ambiente y libre de humedad o calor residual de estufa o la mufla.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual, Soil Survey Investigations Report No. 51 Version 2.0, 2014. pp 314-316.

14.2. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Kellog Soil Survey Laboratory Methods Manual, Soil Survey Investigations Report No. 42 Version 5.0, 2014. pp 495-498.

14.3. Soil Survey Investigation Manual, Report No. 45, version 2.0, February 2011, pp. 245 a 247.

2007UY

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

Método respirométrico, sistema OXITOP®

Elaborado - G. Pistone y M. Capandeguy

Modificado - I. Pandulli

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de demanda bioquímica de oxígeno en efluentes líquidos y aguas naturales. El límite de detección es de 4,6 mg O_2/L y el límite de cuantificación es de 14 mg O_2/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivo determinación de cloro total (INC 22).
2.6. Instructivo de uso desionizador Millipore Elix Essential (INE 121).
2.7. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 16A).
2.8. Instructivo de uso balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
2.9. Instructivo de uso EQUIPO OxiTop® OC110 (INE 96).
2.10. Registro de Preparación de Reactivos y Estándares (RPR 02).
2.11. Registro de Preparación de Soluciones Control (RPS 09).
2.12. Registro de control de equipo (RCE 37 y RCE 112).
2.13. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).
2.14. Ruta de análisis (RFQ 32).
2.15. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

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

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

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

$$2\ NaOH + CO_2\uparrow \rightarrow Na_2CO_3\downarrow + H_2O$$

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

$$DBO = \frac{M(O_2)}{R.Tm}.\left(\frac{Vb - Vm}{Vm} + \frac{Tm}{T_0}\right).\Delta p(O_2)$$

donde:

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

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

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

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

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

V_m: corresponde al volumen de la muestra

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

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

5. INTERFERENCIAS

5.1. La producción de gases diferentes al CO_2 puede introducir errores en la medida de presión, disminuyendo la DBO. A su vez, sustancias que consumen oxígeno como compuestos de hierro II, sulfuro de hidrógeno o dióxido de azufre pueden aumentar la DBO.

5.2. La incompleta absorción de CO_2 puede introducir errores si la cantidad de NaOH absorbente no es suficiente.

5.3. Temperatura: el sistema OxiTop controla el inicio de la medición ya que tiene incluido un ajuste automático de la temperatura (función AutoTemp) que hace que la medición comience sólo cuando la temperatura se ha estabilizado en 20 °C. Esto lleva entre 1 y 3 horas. Por lo tanto, no es necesario termostatizar las muestras exactamente a 20 °C para comenzar la medición. Sin embargo, para que esta función opere correctamente es necesario que la muestra se encuentre entre 15 °C y 21 °C.

5.4. Muestras que contienen cloro residual, metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos no permiten el desarrollo de bacterias que degradan la materia orgánica, y por lo tanto afectan el valor de DBO.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de plástico o vidrio de al menos 1 L de capacidad. Tomar la muestra y llenar el frasco evitando airear. Llenar el recipiente hasta el borde superior, sin cámara de aire.

6.2. Refrigerar la muestra a ≤ 6 °C (>0 °C) y comenzar el análisis preferentemente antes de las 24 horas de recolección. El tiempo máximo de almacenamiento de la muestra es de 48hs.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Incubadora controlada termostáticamente a 20 °C ± 1 °C.

7.2. Bandeja de agitación magnética IS6.

7.3. Botellas de medición color ámbar de 510 mL de capacidad con sus respectivos cabezales de medición OxiTop-C (Marca WTW).

7.4. Vasos de caucho que se ajustan al cuello de las botellas.

7.5. Barras magnéticas agitadoras.

7.6. Controlador OxiTop OC 110 (WTW) con su respectivo software (Achat OC).

7.7. Pipeta automática de volumen variable (rango de 1 mL a 10 mL y 200 µL a 1000 µL.

7.8. Probetas graduadas de 100 mL.

7.9. Balanza de resolución 0,01 g.

7.10. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.11. Erlenmeyers de 500 mL.

7.12. Matraz aforado de 1000 mL.

7.13. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).

7.14. Bureta.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2 según ES01)

8.2. Reactivos:

Absorbente de CO_2: pastillas de hidróxido de sodio (NHP 600, WTW)

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0)

Fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7758-11-4)

Fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($Na_2HPO_4.7H_2O$ Nro. CAS 7782-85-6)

Cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9)

Cloruro de calcio ($CaCl_2$ Nro. CAS 10043-52-4)

Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$ Nro. CAS 10034-99-8)

Cloruro férrico hexahidratado [($FeCl_3$). $6H_2O$ Nro. CAS 7705-08-0]

Ácido sulfúrico o ácido clorhídrico concentrado (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9 o HCl Nro. CAS 7647-01-0)

Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2)

D (+) glucosa anhidra ($C_6H_{12}O_6$ Nro. CAS 50-99-7)

Ácido glutámico ($C_5H_9NO_4$ Nro. CAS 56-86-0)

Inóculo Polyseed® (o similar)

Sulfito de sodio (Na_2SO_3 Nro. CAS 7757-83-7)

Almidón soluble [($8C_6H_{10}O_5$)n Nro. CAS. 9005-25-8]

Yoduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0)

Ácido acético ($C_2H_4O_2$ Nro. CAS 64-19-7)

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

8.3. **Soluciones para ajuste de pH**

a) Solución ácida (H_2SO_4 o HCl, 1 N): diluir 28 mL de H_2SO_4 (concentrado) lentamente con agua destilada a 1 L, enfriando en baño de agua ó diluir 83 mL de HCl (concentrado) en aproximadamente 700 mL de agua y diluir a 1 L.

b) Solución alcalina (NaOH, 1 N): disolver 40 g de NaOH en agua destilada y diluir a 1 L.

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

8.4. **Soluciones de nutrientes**

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

a) Solución buffer fosfato: disolver 4,25 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0), 10,875 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4), 16,7 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($Na_2HPO_4.7H_2O$ Nro. CAS 7782-85-6) y 0,85 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) en 250 mL de agua desionizada y diluir a 500 mL. El pH debe estar en 7,2 ± 0,2, de lo contrario ajustar.

De forma alternativa se puede pesar 21,25 g de KH_2PO_4 y 0,85 g de NH_4Cl y agregar 350 mL de agua desionizada. Completar a 500 mL con agua desionizada. El pH debe estar en 7,2 ± 0,2, de lo contrario ajustar con NaOH.

b) Solución de sulfato de magnesio: disolver 11,25 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4.7H_2O$) en agua desionizada y diluir a 500 mL.

c) Solución de cloruro de calcio: disolver 13,75 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$) en agua desionizada y diluir a 500 mL.

d) Solución de cloruro férrico hexahidratado: disolver 0,13 g de cloruro férrico ($FeCl_3$).$6H_2O$ y diluir a 500 mL con agua desionizada.

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

8.5. **Inóculo**

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

8.6. **Solución ácido glutámico- glucosa**

Secar la glucosa y el ácido glutámico de grado reactivo a 103 °C por 2 horas. Pesar 150,0 mg de glucosa y 150,0 mg de ácido glutámico en un matraz aforado de un litro. Completar con agua de dilución. De preferencia preparar cada día de análisis. De lo contrario almacenar refrigerada por no más de 24 horas. Dejar registro en el RPS correspondiente.

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

8.7. **Reactivos para muestras cloradas**

a) Solución de sulfito de sodio 0,025 N: disolver 0,1575 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) en 100 mL de agua destilada. Esta solución no es estable. Prepararla en forma diaria.

b) Solución de yoduro de potasio: disolver 10 g de yoduro de potasio (KI) en 100 mL de agua destilada.

c) Solución indicadora de almidón: a 5 g de almidón se agrega un poco de agua fría y se tritura en un mortero hasta obtener una pasta fina. Se agrega 1 L de agua destilada hirviendo, se agita bien y se deja en reposo durante una noche. Utilizar el sobrenadante transparente, conservar con 1,25 g de ácido salicílico ($C_7H_6O_3$ Nro. CAS 69-72-7), o 4 g de cloruro de zinc ($ZnCl_2$ Nro. CAS 7646-85-7) o una combinación de 4 g de propionato de sodio ($C_3H_5NaO_2$ Nro. CAS 137-40-6) y 2 g de azida de sodio (NaN_3 Nro. CAS 26628-22-8) por litro de solución de almidón. Mantener a 4 °C.

d) Solución de ácido acético 1+1, o de ácido sulfúrico 1+50.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

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

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

11.2. Neutralización del cloro residual (si corresponde):

Para muestras cloradas se debe neutralizar el cloro previamente a la inoculación de la muestra. El registro de la existencia original de cloro en la muestra se encuentra establecido en la ficha de ingreso correspondiente.

Las muestras que contienen cloro residual se deben dejar por una o dos horas a la luz para disiparlo. En las que persiste, proceder como sigue:

a) Tomar 100 mL de la muestra a analizar en un Erlenmeyer de 250 mL.

b) Adicionar 1,0 mL de ácido acético 1+1, o 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 + 50.

c) Adicionar 1,0 mL de solución de KI

d) Titular con solución de Na_2SO_3 hasta que casi desaparezca el color amarillo de la solución. Añadir a continuación 1 mL de solución de almidón y continuar la titulación hasta su punto final, indicado por la desaparición del color azul.

e) Tomar Gasto Total.

f) Al poner la porción de la muestra a analizar en la botella de medición, adicionar a la misma la cantidad de Na_2SO_3 necesaria para neutralizar el cloro residual, de acuerdo a la valoración arriba descripta. Para lograr esto, prepararla en un matraz y luego repartir en las botellas de DBO. El volumen a adicionar de solución de Na_2SO_3 se calcula de la siguiente manera:

$$VNa_2SO_3 = (GNa_2SO_3 \times Vmuestra) / 100$$

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

Nota 4: el agregado de exceso de solución de Na_2SO_3 produce consumo de oxígeno, por lo tanto debe ser agregado solamente en la cantidad necesaria.

Determinación de DBO5 en aguas naturales.

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

Se excluyen de este procedimiento aquellas muestras cuyo pH esté fuera del rango 6-9 porque en ese caso es muy probable que la actividad microbiana se encuentre alterada, lo que arrojaría resultados falsos. Por lo tanto, estas muestras deben ser tratadas como efluentes líquidos (ver punto 11.4).

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

- Termostatizar la muestra entre 15 °C y 21 °C.
- Homogeneizar la muestra y colocar el volumen adecuado directamente en la botella de medición color ámbar de 510 mL. Agregar 1 mL de cada uno de los cuatros nutrientes.
- Insertar una barra magnética en cada botella.
- Usando pinzas colocar dos pastillas de hidróxido de sodio en el vaso de caucho e insertar éste en el cuello de la botella. Los vasos de caucho también cumplen la función de asegurar un cierre hermético con los cabezales.

- Cerrar herméticamente la botella con los cabezales de medición OxiTop-C.
- Comenzar la medición con el controlador OxiTop OC 110 (ver INE 96).
- Colocar las botellas de medición en la plataforma de agitación dentro de la incubadora.
- Enchufar el motor de la plataforma una vez que todas las botellas hayan sido colocadas.
- Incubar las muestras por 5 días a (20 ± 1) °C.
- Incubar junto con las muestras, los controles de calidad correspondientes (ver punto 13.3)
- Luego de 5 días leer los valores de DBO (se obtienen directamente del controlador en mg O2/L).

No es necesario ningún cálculo posterior.

Tabla 1

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

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

Determinación de DBO_5 en efluentes líquidos.

11.4. Para poder medir la DBO en este tipo de muestras se les debe agregar nutrientes y microorganismos. Usar el valor de DQO para estimar el valor de la DBO y en función de esto seleccionar el rango y el volumen adecuado como se muestra en la Tabla 2. Si no se conoce la relación entre la DQO y la DBO asumir que la DBO es aproximadamente 3 veces menor que la DQO. Si el valor estimado de DBO es mayor a 800 mg O_2/L, se realiza una dilución primaria, 1:10 (por peso), en un matraz aparte, y se toma una porción adecuada de dicha dilución. Dejar registro en la ruta de análisis.

- Termostatizar la muestra entre 15 °C y 21 °C.
- Homogeneizar la muestra y colocar el volumen elegido directamente en la botella de medición color ámbar de 510 mL. Agregar 10 mL del inóculo bacteriano y 1 mL de cada uno de los cuatros nutrientes.
- Insertar una pastilla magnética a cada botella.
- Con la ayuda de unas pinzas insertar dos pastillas de hidróxido de sodio en los vasos de caucho y colocar éstos en el cuello de la botella. Los vasos de caucho también cumplen la función de asegurar un cierre hermético con los cabezales.
- Cerrar las botellas fuertemente con los cabezales de medición OxiTop.
- Comenzar la medición con el controlador OxiTop OC 110 (ver INE 96).
- Colocar las botellas de medición en la plataforma de agitación dentro de la incubadora.
- Enchufar el motor de la plataforma una vez que todas las botellas hayan sido colocadas.
- Incubar las muestras por 5 días a (20 ± 1) °C.
- Junto con las muestras incubar los controles de calidad correspondientes (ver punto 13)
- Luego de 5 días leer los valores de DBO (se obtienen directamente del controlador en mg O_2/L) y realizar los cálculos correspondientes (ver punto 12.2).

Tabla 2

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

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

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. **Aguas naturales**

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

12.2. **Efluentes líquidos**

En el caso de los efluentes industriales, la DBO_5 de la muestra se calcula como:

Fórmula 1:

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

donde:

DBO_5 muestra: corresponde al valor de DBO leído directamente del controlador en mg O_2/L al día 5.

DBO_5 siembra: corresponde al valor de DBO del control de siembra leído directamente del controlador.

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

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

Vol final: corresponde al Volumen total que hay en la botella donde se incuba la muestra.

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

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

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

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

Insertar una pastilla magnética a la botella, colocar el vaso de caucho en el cuello de la botella y con la ayuda de unas pinzas insertar dos pastillas de hidróxido de sodio en el vaso.

Cerrar la botella fuertemente con el cabezal y comenzar la medición con el controlador OxiTop OC110, especificando el rango de medición de 0-400 ya que el volumen final de la botella es de 164 mL.

13.2. **Control de exactitud:** Este control se realiza con la solución de glucosa- Ac. glutámico descrita en el punto 8.6; permite verificar la efectividad de los microorganismos y del sistema de medición, por lo que debe hacerse de rutina cada vez que se incuben muestras.

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

Insertar una pastilla magnética a la botella, colocar el vaso de caucho en el cuello de la botella y con la ayuda de unas pinzas insertar dos pastillas de hidróxido de sodio en el vaso.

Cerrar la botella fuertemente con el cabezal y comenzar la medición con el controlador OxiTop OC110, especificando el rango de medición de 0-400 ya que el volumen final de la botella es de 164 mL.

Leer el valor de DBO5 en mg O_2/L directamente del controlador. Realizar los siguientes cálculos para corregir este valor por la dilución efectuada y por el consumo de oxígeno del control de siembra:

Fórmula 2:

$$DBO_5 = (DBO_5\ GGA - \frac{DBO_5\ siembra \times Vol\ siembra}{Vol\ control\ de\ siembra} \times \frac{Vol\ final}{Vol\ GGA}$$

donde:

DBO_5 GGA: corresponde al valor de DBO de la solución control de ácido glutámico-glucosa leído directamente del controlador en mg O_2/L al día 5.

DBO5 siembra: corresponde al valor de DBO del control de siembra leído directamente del controlador en mg O_2/L al día 5

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

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

Vol final: corresponde al Volumen total que hay en la botella donde se incuba la muestra (164).

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

El valor final de la solución control GGA deber encontrarse dentro de los límites de control establecidos en el gráfico de control correspondiente.

13.3 **Control de la precisión:** El rango normalizado de los distintos valores de DBO5 obtenidos para una muestra analizada por duplicado, debe ser menor a los límites establecidos en el gráfico de control correspondiente. Dejar registro en el gráfico de control de precisión, construido según el manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Biochemical oxygen demand (BOD) 5210 D. Respirometric Method pp. 540-543.

14.2. System OxiTop Control®, Manual de Operación.

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

14.4. “Supervision of BOD measuring systems according to DIN/ISO 9000 and GLP” WTW Application Report 2010.

14.5. “Respirometric BOD5 determination of domestic waste water” WTW Application Report 2010.

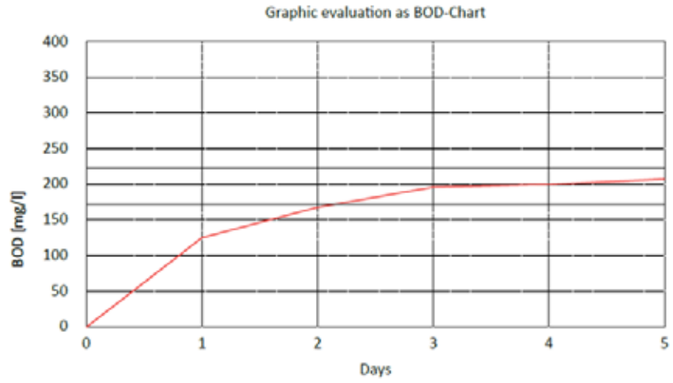
14.6. “Respirometric BOD5 determination of waste water polluted with organic or inorganic toxins or inhibitors” WTW Application Report 2010.

14.7. Instrucciones de uso inoculo bacteriano Polyseed o similar.

ANEXO I

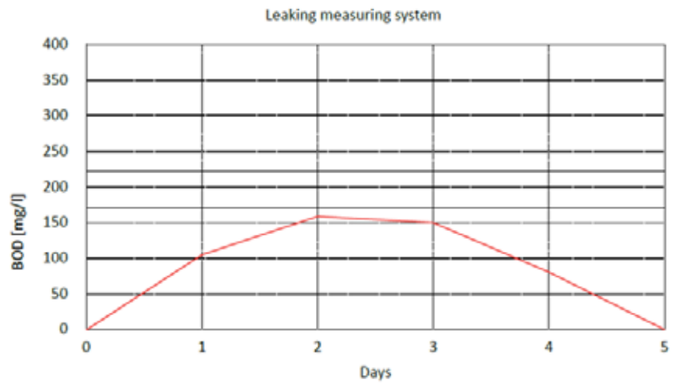
Interpretación de gráficos

Curva Ideal



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

Sistema con fugas



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

2008UY

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



Elaborado - F. Lauber

Modificado - I. Pandulli

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de demanda bioquímica de oxígeno en efluentes líquidos domésticos e industriales, aguas contaminadas y naturales en el rango entre 1,3 mg O_2/L y 6.000 mg O_2/L. El límite de detección es de 0,42 mg O_2/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivo determinación de cloro total (INC 22).
2.6. Instructivo de equipos desionizador Millipore Elix Essential (INE 121).
2.7. Instructivo de uso analizador de iones Orion (INE 08).
2.8. Instructivo de uso analizador de iones WTW (INE 63).
2.9. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16A).
2.10. Instructivo de uso balanza analítica (INE 94).
2.11. Instructivo de uso de plancha calefactora y agitador (INE 129).
2.12. Ruta de análisis (RFQ 06).
2.13. Registro de Preparación de Reactivos y Estándares (RPR 02).
2.14. Registro de Preparación de Soluciones Control (RPS 09).
2.15. Registro de control de equipo (RCE 57 / RCE 112/ RCE37).
2.16. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).
2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) corresponde a la cantidad de oxígeno consumido para la degradación bioquímica de la materia orgánica contenida en la muestra (demanda carbonosa), durante un intervalo de tiempo específico y a una temperatura determinada. La muestra o diluciones adecuadas de la misma en un frasco sin cámara de aire, se incuba a 20 °C ± 1 °C durante 5 días. El Oxígeno Disuelto (OD) se mide antes y después de los 5 días de incubación y la DBO_5 se determina por la diferencia entre el OD inicial y final.

3.2. Además de la degradación de materia orgánica (demanda carbonosa), el ensayo mide también la cantidad de oxígeno utilizado para oxidar material inorgánico como sulfuros e ion ferroso, y formas reducidas de nitrógeno como amonio y nitrógeno orgánico (demanda nitrogenada), a menos que se emplee un inhibidor de nitrificación para prevenir su oxidación.

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

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

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Utilizar guantes, lentes de seguridad y túnica para el tratamiento de las muestras.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Muestras que contienen cloro residual, metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos no permiten el desarrollo de bacterias que degradan la materia orgánica.

5.2. Altos contenido de peróxido de hidrógeno (que pueden encontrarse en efluentes con procesos industriales de blanqueo; papeleras y plantas textiles), puede causar niveles de oxígeno iniciales supersaturados, e interferir con el valor obtenido de DBO.

5.3. Muestras de agua provenientes de lugares fríos o con alta producción de fotosíntesis pueden causar niveles de oxígeno iniciales supersaturados, e interferir con el valor obtenido de DBO.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o similar). Tomar la muestra y llenar el frasco evitando airear. Llenar el recipiente hasta el borde superior sin cámara de aire. El volumen de muestra típica es de 1.000 mL.

6.2. Refrigerar la muestra a ≤ 6 °C (>0 °C) y comenzar el análisis preferentemente antes de las 24 horas de recolección. El tiempo máximo de almacenamiento de la muestra es de 48hs.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Incubadora controlada termostáticamente a 20 °C ± 1 °C. Excluir toda luz para prevenir la posibilidad de producción de oxígeno por fotosíntesis.

7.2. Botellas de incubación de 300 mL de capacidad, preferentemente con sello de agua y tapón de plástico.

7.3. Electrodo de membrana selectiva al oxígeno, con compensación automática de temperatura y barra agitadora incorporada (WTW Inolab o similar). (Pilas V357 de preferencia o similar, de forma que aseguren buena diferencia de potencial).

7.4. Analizador de iones (WTW Inolab o similar).

7.5. Desionizador de agua Millipore Elix Essential o similar.

7.6. Agitador magnético.

7.7. Pipetas automáticas de volumen variable (rango de 1 mL a 10 mL y 200 µL a 1000 µL).

7.8. Balanza de resolución 0,01 g.

7.9. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.10. Matraces.

7.11. Probetas graduadas de 100 mL.

7.12. Recipiente para el agua de dilución (Nalgene de 20 L de capacidad o similar).

7.13. Canastas para transporte de botellas de incubación.

7.14. Vasos de Bohemia.

7.15. pHmetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).

7.16. Bureta.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ES 01) para la preparación de las soluciones. Debe cumplir de los controles de calidad del método, establecidos en el punto 13.

8.2. **Soluciones para ajuste de pH:** soluciones ácida (H_2SO_4 Nro. CAS 7664 -93-9) y alcalina (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) de concentración 1 N para neutralización de muestras cáusticas o ácidas.

a) Solución ácida: diluir 28 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4(cc) lentamente con agua desionizada a 1 L, enfriando en baño de agua.

b) Solución alcalina: disolver 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua desionizada y diluir a 1 L.

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

8.3. **Soluciones de nutrientes:** almacenar refrigerada a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta un máximo de 6 meses. Descartar en caso de apreciable crecimiento biológico o precipitación. Dejar registro de su preparación. Las soluciones de nutrientes pueden ser esterilizadas en autoclave para proveer una mayor duración de las mismas.

a) Solución buffer fosfato: disolver 4,25 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0), 10,875 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4), 16,7 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($Na_2HPO_4.7H_2O$ Nro. CAS 7782-85-6) y 0,85 g de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) en 250 mL de agua desionizada y diluir a 500 mL. El pH debe estar en 7,2 ± 0,2, de lo contrario ajustar.

De forma alternativa se puede pesar 21,25 g de KH_2PO_4 y 0,85 g de NH_4Cl y agregar 350 mL de agua desionizada. Completar a 500 mL con agua desionizada. El pH debe estar en 7,2 ± 0,2, de lo contrario ajustar con NaOH.

b) Solución de sulfato de magnesio: disolver 11,25 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4.7H_2O$ Nro. CAS 10034-99-8) en agua desionizada y diluir a 500 mL.

c) Solución de cloruro de calcio: disolver 13,75 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$ Nro. CAS 10043-52-4) en agua desionizada y diluir a 500 mL.

d) Solución de cloruro férrico: disolver 0,125 g de cloruro férrico ($FeCl_3.6H_2O$ Nro. CAS 10025-77-1) y diluir a 500 mL con agua desionizada.

8.4. **Inóculo**

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

a) Muestra de un efluente no clorado proveniente del mismo ramo de industria (500 µL de efluente por botella de incubación).

b) Inóculo bacteriano comercial (Polyseed® o similar): Suspender el contenido de una cápsula en 500 mL de agua de dilución durante 1 hora con agitación constante. Dejar decantar el sobrenadante (aserrín que actúa como carrier para los microorganismos), y transvasar la solución a un matraz adecuado. La toma para inocular las botellas de DBO debe realizarse manteniendo agitación continua. De preferencia utilizar en el mismo día de preparada, luego descartar. En todos los casos, mantener refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C) y no utilizar más allá de las 24 h de preparada.

8.5. **Reactivos para muestras cloradas**

a) Solución de sulfito de sodio 0,025 N: disolver 0,1575 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3 Nro. CAS 7757-83-7) en 100 mL de agua destilada. Esta solución no es estable. Prepararla en forma diaria.

b) Solución de yoduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0): disolver 10,00 g de KI en 100 mL de agua desionizada.

c) Solución indicadora de almidón: 5 g de almidón [$(C_6H_{10}O_5)$n Nro. CAS 9005-25-8] en 1 L de agua desionizada. Prepararla en forma diaria.

d) Solución de ácido acético ($C_2H_4O_2$ Nro. CAS 64-19-7 1+1, o de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 1+ 50.

8.6. **Solución control de ácido glutámico - glucosa:** Preparar la solución de control conteniendo: 150,0 mg de glucosa ($C_6H_{12}O_6$ Nro. CAS 50-99-7) + 150,0 mg de ácido glutámico ($C_5H_9NO_4$ Nro. CAS 56-86-0), en 1000 mL de agua desionizada. Previo a la pesada, secar la glucosa y el ácido glutámico de grado reactivo a 103 °C por 2 horas. Dejar registro. De preferencia prepararla en forma diaria. Puede almacenarse refrigerada a ≤ 6 °C (> 0° C) por un máximo de 24 horas. Alternativamente puede utilizarse material de referencia certificado.

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

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

En el recipiente de agua de dilución, tomar el volumen necesario de agua desionizada dejando como mínimo una cámara de aire que corresponda al 20 % del volumen total del recipiente, para permitir una adecuada agitación. Agregar 1 mL por litro de agua de las siguientes soluciones de nutrientes: buffer fosfato, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, y cloruro férrico. Agitar vigorosamente el recipiente para permitir la oxigenación del agua de dilución. Termostatizar a 20 °C ± 3 °C el agua de dilución previo a su uso. El contenido de oxígeno debe ser de al menos 7,5 mg O_2/L.

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

Si el pH de la muestra se encuentra fuera del rango de pH 6,0 – 8,0, neutralizar la fracción de la muestra a incubar empleando H_2SO_4 o NaOH de forma que su pH final se encuentre entre 6.5 -7,5. Debe quedar registro que se realizó corrección de pH. La cantidad de reactivo no debe diluir la muestra en más de 0,5 %.

11.3. Neutralización del cloro residual (si corresponde):

Para muestras cloradas se debe neutralizar el cloro previamente a la inoculación de la muestra. La determinación de la existencia original de cloro en la muestra se realiza según el INC 22. Las muestras que contienen cloro residual se deben dejar por una o dos horas a la luz para disiparlo. Luego, proceder como sigue:

a) Tomar 100 mL de la muestra a analizar en un Erlenmeyer de 250 mL.

b) Adicionar 1,0 mL de ácido acético 1 + 1, o 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 + 50.

c) Adicionar 1,0 mL de solución de KI. Si luego de agregar el KI la solución vira a color amarillo, continuar con el procedimiento. Si no se observa el viraje, no continuar y registrar la observación.

d) Titular con solución de Na_2SO_3 hasta que casi desaparezca el color amarillo de la solución. Añadir a continuación 1 mL de solución de almidón (5 g de almidón por litro de agua) y continuar la titulación hasta su punto final, indicado por la desaparición del color azul.

e) Registrar el gasto total de solución de Na_2SO_3.

f) Al poner la porción de la muestra a analizar en la botella de DBO, adicionar a la misma la cantidad de Na-2SO_3 necesaria para neutralizar el cloro residual, de acuerdo a la valoración arriba descripta. Para lograr esto, prepararla en un matraz y luego repartir en las botellas de DBO. El volumen a adicionar de solución de Na_2SO_3 se calcula de la siguiente manera:

$$V_{Na2SO3} = (G_{Na2SO3} \times V_{muestra}) / 100$$

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

Nota 3: el agregado de exceso de solución de Na_2SO_3 produce consumo de oxígeno, por lo tanto debe ser agregado solamente en la cantidad necesaria.

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

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

11.5. Muestras supersaturadas en OD (si corresponde):

En muestras con niveles de oxígeno disuelto por encima del punto de saturación a 20 °C y 760 mmHg de presión, 9,2 mg 0_2/L (aguas muy frías o con alta producción de fotosíntesis), reducir el oxígeno dejándola en recipiente abierto, completo hasta la mitad, y agitando vigorosamente de vez en cuando, antes de su análisis.

Análisis de la muestra

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

11.6. Estimación de las diluciones:

Realizar al menos 4 diluciones de la muestra. La estimación de la DBO_5 puede realizarse en base a alguna de las siguientes maneras:

a) Valor de DQO de la muestra. Tomando en cuenta el promedio de las relaciones históricas DQO/DBO_5 y el valor de DQO actual, estimar el valor de DBO_5 de la muestra. Con dicho valor, en la Tabla “DBO estimada/Toma” (ver Anexo), realizar las diluciones con aquellos volúmenes correspondientes al valor inmediatamente anterior y posterior al valor estimado, y el tercer o cuarto volumen anterior y posterior a la DBO estimada en un principio. Para casos de DBO estimada menor a 15 mg O_2/L, se aconseja tomar los siguientes volúmenes: 50, 100, 150, y 200 mL.

b) Si no se cuenta con un valor estimado de DBO_5, realizar diluciones en los siguientes rangos:

- 0,01 - 1 % para desechos industriales cargados.
- 1 a 5 % para efluentes industriales no tratados.
- 5 - 25 % para efluentes tratados biológicamente.
- 25 - 100 % para aguas naturales contaminadas.

11.7. Preparación de las diluciones e incubación:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nota 4: Se sugiere el empleo de 5, 10, 15 y 20 mL de siembra de forma tal que se produzca una reducción del OD de al menos 2,0 mg O_2/L, y que contengan una cantidad de OD residual de al menos 1,0 mg O_2/L, después de 5 días de incubación. En caso que los volúmenes no cumplan con el requisito anterior, ajustar los mismos.

- tres botellas con **solución control**: conteniendo 6 mL de la solución control de ácido glutámico - glucosa (GGA), 3 mL de la solución de inóculo, y agua de dilución.
- realizar al menos **una muestra por duplicado**, por día de análisis.

Al igual que el resto de las muestras, medir el oxígeno disuelto inicial previo a la incubación (20 °C ± 1 °C por 5 días ± 6 horas) y luego realizar las lecturas del oxígeno disuelto final.

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

11.9. Procedimiento:

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

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

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

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

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

11.10. Control de calidad. Para el caso de aguas naturales debe ser incubado un duplicado por cada día de análisis. Realizar control de blanco, al igual que 11.8. No requiere controles de siembra, ni solución control (GGA).

12. ANÁLISIS DE DATOS

Solamente se consideran como válidas aquellas botellas en las cuales se produjo una reducción del OD de al menos 2,0 mg O_2/L, y que contengan una cantidad de OD residual de al menos 1,0 mg O_2/L, después de 5 días de incubación.

2,0 mg O_2/L es la mínima cantidad que se requiere para producir una medida válida de OD, y se necesita al menos 1.0 mg O_2/L remanente para asegurar que la tasa de oxidación de la materia orgánica no se vea afectada por falta de oxígeno.

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

$$DBO_5 \text{ (mg } O_2\text{/L)} = [(OD_i - OD_f) - \text{prom SCF}] \times (300 / Vm)$$

donde:

OD_i= Oxígeno disuelto inicial (mg/L) de la muestra diluida

OD_f= Oxígeno disuelto final (mg/L), al cabo de 5 días de incubación de la muestra diluida

Volumen total botellas: 300mL

Vm= volumen de la muestra en la dilución, corregido por factor de dilución (si corresponde)

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

Se promedia el valor de DBO_5 de todas las botellas que cumplen con el criterio de validez indicado arriba. Se deben tener como válidos al menos 2 valores de forma tal de poder realizar el promedio y el cálculo del rango normalizado (aceptación <30%). En caso contrario, repetir el análisis informando el valor obtenido en forma estimada.

Si todas las botellas presentan un OD residual menor a 1,0 mg O_2/L, se selecciona la botella con la mayor dilución (la que presenta menor concentración de OD), y se calcula con ésta la DBO_5 estimada (se expresa como DBO > a dicho valor). Repetir el análisis a efectos de poder informar un valor más certero.

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

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

$$DBO_5 \text{ (mg } O_2\text{/L)} = (OD_i - OD_f)$$

donde:

OD_i= Oxígeno disuelto inicial (mg/L) de la muestra antes de la incubación

OD_f= Oxígeno disuelto final (mg/L), luego de 5 días de incubación

Para estas muestras no es necesario tener una depleción de OD de al menos 2,0 mg O_2/L.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

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

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

El SFC se calcula según la siguiente ecuación:

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

donde:

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

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

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

13.3. **Control de la exactitud:** El valor promedio de DBO de las 3 soluciones control incubadas junto a cada serie de muestras, debe dar entre 198 mg O_2/L ± 30,5 mg O_2/L; en caso contrario repetir el batch de análisis e informar valores estimados por control de calidad.

- Valores de DBO mayores al rango de aceptación, indican el uso de mayor cantidad de inóculo, agua de dilución contaminada, o la presencia de microorganismos nitrificadores
- Valores de DBO menores al rango de aceptación pueden indicar mala calidad del inóculo o menor cantidad del mismo, o la presencia de tóxicos.

$$DBO_5 \text{ (mg } O_2\text{/L)} = [(OD_i - OD_f) - \text{prom SCF}] \times (300 / 6)$$

donde:

OD_i corresponde a Oxígeno disuelto inicial (mg/L) de la solución control

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

Volumen total botellas: 300 mL

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

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

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

13.4. **Control de la precisión:** El rango normalizado de los distintos valores de DBO_5 obtenidos para una muestra analizada por duplicado, debe ser menor a los límites establecidos en el gráfico de control correspondiente. Dejar registro en el gráfico de control de precisión, construido según el manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Biochemical oxygen demand (BOD) 5210 B. pp. 532-537.

14.2. Instrucciones de uso del inoculo bacteriano (Polyseed® o similar).

2009UY

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

Método espectrofotométrico, reflujo cerrado

Elaborado - F. Lauber

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de demanda química de oxígeno en efluentes domésticos e industriales líquidos, aguas contaminadas y naturales en el rango entre 29 mg O_2/L y 1000 mg O_2/L. El límite de detección es de 9,7 mg O_2/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del digestor (INE 105).

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A y B, INE 94, INE 115).

2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 146).

2.8. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.9. Ruta de análisis (RFQ 07).

2.10. Ruta de Curva DQO (RFQ 48).

2.11. Registro de preparación de soluciones control (RPS 01).

2.12. Registro de preparación de reactivos y estándares (RPR 01).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA(ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es la medida de oxígeno equivalente a la materia orgánica que es susceptible a ser oxidada por un oxidante químico específico fuerte, en condiciones controladas de temperatura y tiempo. La cantidad de oxidante consumido se expresa en términos de su equivalencia de oxígeno.

3.2. Los componentes tanto orgánicos como inorgánicos de la muestra son pasibles de oxidación, pero en la mayoría de los casos predominan los componentes orgánicos y son de mayor interés.

3.3. La demanda química de oxígeno es un ensayo definido, el alcance en cuanto a la oxidación de la muestra puede ser afectada por el tiempo de digestión, la fuerza del reactivo y la concentración de DQO que posee la muestra.

3.4. La muestra se oxida con una cantidad conocida de dicromato de potasio en exceso, en medio ácido y en presencia de catalizadores a 150 °C ± 2 °C, en un sistema cerrado. En el caso de la determinación de DQO a concentraciones mayores a 100 mg O_2/L, el cromato resultante de la reducción del dicromato es determinado espectrofotométricamente a 600nm. Para concentraciones menores a 100 mg O_2/L, se determina espectrofotométricamente la disminución del dicromato inicial a 420nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y lentes de seguridad. Campana de extracción para alojar el digestor.

4.2. Trabajar en campana de extracción de vapores.

4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.4. Tener especial cuidado con la solución de dicromato de potasio; dicha solución contiene además del dicromato que es tóxico, una sal de mercurio que es extremadamente tóxica por contacto con la piel y los ojos. La solución de ácido sulfúrico también puede causar quemaduras por contacto con los ojos y la piel.

4.5. Disposición final de residuos: En este análisis son generados residuos peligrosos de mercurio, cromo hexavalente, plata y ácidos, por lo que se debe tener especial cuidado en su disposición final. Se procede de acuerdo al Manual de Gestión de Calidad, procedimiento PR 15, “Disposición Final de Residuos Generados”.

5. INTERFERENCIAS

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

5.2. La interferencia más común es el ion cloruro. El cloruro reacciona con el ion plata para precipitar cloruro de plata, y esto inhibe la acción catalítica de la plata. Bromuro, yoduro y cualquier otro reactivo que inactive el ion plata puede interferir de forma similar. Este tipo de interferencia es negativa ya que tiende a restringir la acción oxidante del dicromato. Aunque bajo condiciones estrictas de digestión el cloruro, el bromuro o el yoduro pueden reaccionar con dicromato y producir la forma elemental del halógeno y del ión de cromo, resultando en un error positivo. La presencia del cloruro puede superarse parcialmente formando complejos con el sulfato de mercurio antes de que sea realizado el reflujo. El presente procedimiento no es apto para analizar muestras que contengan cloruro en concentración superior a 2000 mg Cl^-/L.

5.3. Los iones inorgánicos reducidos tales como: hierro ferroso, sulfuro, magnesio, manganeso, etc. son oxidados cuantitativamente bajo las condiciones de análisis. Para muestras conteniendo niveles significativos de estos iones, suponiendo que se oxidan estequiométricamente, y conociendo su concentración inicial se obtiene el valor de la DQO por medio de correcciones.

5.4. Los compuestos alifáticos volátiles de cadena larga pueden no ser oxidados completamente aunque lo son en su mayoría por tratarse de un reflujo cerrado.

5.5. Si la muestra es preservada con ácido sulfúrico concentrado y es utilizada para relacionarla con DBO o TOC, verificar que todas las determinaciones sean realizadas en las mismas condiciones.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), un volumen mínimo de 100 mL sin cámara de aire. Refrigerar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Analizar dentro de las 24 h de extraída la muestra. En caso de necesitar preservar la muestra, llevar a pH < 2 con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y refrigerar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C); teniendo en este caso 28 días para analizar la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm (para rango de DQO alto) y 420 nm (para rango de DQO bajo). Adaptador para celdas de sección circular de 16 mm de diámetro.

7.2. Digestor: block de aluminio con huecos circulares, para alojar tubos de 16 mm de diámetro, que opere a 150 °C ± 2 °C. Los tubos deben poder ingresar y ser extraídos de los huecos fácilmente, para evitar que sean rayados.

7.3. Tubos de digestión: tubos de borosilicato con tapa de rosca resistente al calor y contratapa de teflón, de 7,5 mL de capacidad y 16 mm de diámetro externo. Asegurar que los tubos utilizados como celdas de lectura posean buena calidad óptica.

7.4. Matraces aforados de 500 mL

7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (1-10 mL) y punteros correspondientes

7.6. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 µL) y punteros correspondientes

7.7. Vasos de Bohemia o Erlenmeyers

7.8. Dispensadores de volumen variable (1-10 mL)

7.9. Balanza de resolución 0,01 g (AND HF 2000G o similar)

7.10. Balanza de resolución 0,0001 g (Precisa 205 o similar)

7.11. Desionizador de agua

7.12. Equipo para filtración (para el caso de realizar análisis de DQO filtrada)

7.13. Campana de extracción de gases.

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

8. REACTIVOS

8.1. **Solución de digestión para curva de altas concentraciones:** Agregar a 500 mL de agua desionizada 10,216 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$ Nro. CAS 7778-50-9) previamente secado a 150 °C por 2 horas, 167 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 cc Nro. CAS 7664-93-9) y 33,3 g de sulfato mercúrico ($HgSO_4$ Nro. CAS 7783-35-9). Disolver, enfriar a temperatura ambiente y diluir a 1000 mL. Almacenar en campana. En forma alternativa puede ser almacenado debidamente etiquetado en lugar oscuro.

8.2. **Solución de digestión para curvas de bajas concentraciones:** preparar de la misma forma que la solución para curva de altas concentraciones pero agregando 1,022 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$ Nro. CAS 7778-50-9).

8.3. **Solución de ácido sulfúrico:** Agregar sulfato de plata (Ag_2SO_4 Nro. CAS 10294-26-5) a ácido sulfúrico concentrado en una relación de 5,5 g/kg de H_2SO_4 (si la densidad del H_2SO_4 concentrado es 1,84 g/mL entonces la adición de Ag_2SO_4 es de 25,3 g en 2,5 L de H_2SO_4). Agitar por inversión esporádicamente. Esperar 1 o 2 días antes de usar esta solución para permitir la disolución completa del Ag_2SO_4.

8.4. **Solución estándar de ftalato ácido de potasio, 1000 mg O_2/L:** Secar ftalato ácido de potasio (KHP Nro. CAS 877-24-7) a 110 °C hasta peso constante. Disolver 425 mg en agua desionizada y diluir a 500 mL en matraz aforado. Conservar la solución refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C). Esta solución es estable por cuatro meses. En caso de observar alteración de la solución, descartar.

8.5. **Solución estándar de ftalato ácido de potasio (KHP), 200 mg O_2/L:** Diluir con material aforado 5 veces la solución estándar de 1000 mg O_2/L. Emplear agua desionizada. Esta solución es estable por tres meses. En caso de observar alteración de la solución, descartar.

8.6. Agua desionizada (según ES 01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

9.2. Termostatizar la muestra a temperatura ambiente, realizarlo lentamente para evitar la formación de precipitaciones.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Curva de calibración: Realizar una curva de calibración de por lo menos 4 diluciones del estándar.

Para curva de altas concentraciones: Colocar en tubos de digestión: 0,25; 0,5; 1,25; 1,75 y 2,5 mL de la solución estándar de KHP de concentración aproximada 1000 mg O2/L y completar a un volumen final de 2,5 mL con agua desionizada. Estas soluciones corresponden a 100, 200, 500, 700 y 1000 mg O_2/L respectivamente. Hacer un blanco de reactivos, con 2,5 mL de agua desionizada.

Para curva de bajas concentraciones: Colocar en tubos de digestión: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 y 1,2 mL de la solución estándar de KHP de concentración aproximada 200 mg O_2/L y completar un volumen final de 2,5 mL con agua desionizada. Estas soluciones corresponden a 32, 48, 64, 80 y 96 mg O_2/L respectivamente. Hacer un blanco de reactivos con 2,5 mL de agua desionizada en un tubo de digestión.

Blancos para bajas concentraciones: Utilizar un blanco sin digerir como solución de referencia; y compararlo con el blanco digerido para confirmar la reacción analítica correcta y para determinar el blanco del método (aceptando un 10 % de apartamiento).

10.2. Agregar, trabajando en campana de extracción de gases, a cada tubo de digestión 1,5 mL de solución de digestión correspondiente (según se trabaje con altas o bajas concentraciones) y 3,5 mL de solución de ácido sulfúrico.

10.3. Tapar bien los tubos de digestión y agitarlos vigorosamente en forma circular, manteniéndolos en posición vertical.

10.4. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C ± 2 °C durante 2 horas.

10.5. Enfriar los tubos a temperatura ambiente. Para acelerar el proceso de enfriamiento pueden ser colocados en una gradilla dentro de un baño de agua. Secar los tubos con papel absorbente. La gradilla debe ser adecuada para no deteriorar la calidad del vidrio de los tubos, ya que se usan como celda en el espectrofotómetro. Para curva de altas concentraciones realizar el ajuste de cero del equipo a 600 nm con un tubo conteniendo agua desionizada en el portacelda. Para la curva de bajas concentraciones realizar el mismo procedimiento pero a 420 nm.

10.6. Para curva de altas concentraciones: Leer la absorbancia a 600 nm. Para esto, ir girando el tubo y leyendo las absorbancias indicadas en el display del equipo. Registrar el menor valor leído.

Graficar la absorbancia leída en función de la concentración del estándar mg O_2/L.

10.7. Para la curva de bajas concentraciones: Leer la absorbancia a 420 nm de igual forma que para 600 nm y graficar "(absorbancia del blanco digerido – absorbancia de estándar)" en función de la concentración de cada estándar.

Nota 2: La calibración del método es realizada una vez al año, o cuando se utiliza un nuevo lote de reactivos o cada vez que un control de exactitud no se encuentre dentro del rango de los límites aceptados; (ver 13.1), lo que se cumpla primero.

Nota 3: La mezcla de reactivos puede ser realizada previamente y almacenada en los tubos de digestión bien tapados hasta su uso. Tener la precaución de que la mezcla de la solución de digestión con el ácido sulfúrico es exotérmica por lo que alcanza altas temperaturas.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Homogeneizar la muestra. Tomar 2,5 mL de muestra o una alícuota adecuada tal que la concentración de DQO esté en el rango lineal, en un tubo de digestión y completar con agua desionizada a 2,5 mL de volumen final. Si la toma debe ser menor a 1 mL realizar una dilución previa de la muestra y luego tomar 2,5 mL de esta dilución. La digestión de la muestra debe hacerse por duplicado.

Nota 4: Estimar la dilución para la digestión, en base a resultados de análisis anteriores de la muestra. En caso de no contar con antecedentes para matrices de efluentes industriales, trabajar con curva de altas concentraciones en primera instancia, si el resultado del análisis es menor a 100 mg O_2/L, reportar como tal o a solicitud del cliente, realizar la determinación de la muestra con curva de bajas concentraciones. Para el caso de muestras de aguas naturales y no contaminadas, trabajar con curva de bajas.

11.2. Agregar a cada tubo de digestión 1,5 mL de solución de digestión y 3,5 mL de solución de ácido sulfúrico. Tapar bien los tubos de digestión y agitarlos vigorosamente en forma circular, manteniéndolos en posición vertical.

11.3. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C durante 2 horas.

Nota 5: las muestras y la Solución Control deben ser digeridas simultáneamente en el mismo equipo. En caso de tener que diluir la muestra se debe realizar una dilución para cada tubo de digestión (independientemente que se considere la misma concentración final de la dilución a realizar o dos concentraciones finales diferentes).

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

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

$$\mathrm{Abs_{estándar}} = \mathrm{a} \times \left(\frac{\mathrm{mgO_2}}{\mathrm{L}}\right) + \mathrm{b}$$

Dónde:

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

La concentración de DQO se calcula según la siguiente ecuación:

$$DQO\left(\frac{mgO_2}{L}\right) = \frac{(Abs\ muestra\ - b)}{a} \times FD \times \frac{2{,}5}{T}$$

Dónde:

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

T: corresponde a mL de muestra tomada para el ensayo

Los resultados se expresan en mg O_2/L.

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

$$Abs_{estándar} - Abs_{blanco} = a \times C + b$$

Dónde:

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

C: corresponde a la concentración en mgO_2/L

La concentración de DQO se calcula según la siguiente ecuación:

$$DQO\left(\frac{mgO_2}{L}\right) = \frac{(Abs_{muestra} - Abs_{blanco} - b)}{a}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Tomar 1,25 mL y 0,25 mL de solución de control preparada según Manual de Control de Calidad analítico PGC04. Se manipula la solución control y se analiza como se describe en el punto 11 'Análisis de la muestra'. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites aceptados, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis. Si no se encuentra causa aparente, se deberá preparar nueva curva de calibración. Para el análisis en curva de bajas concentraciones (0 a 100 mg O_2/L), se emplea una solución control de la de altas diluida 10 veces.

Con cada serie de digestión realizar un control de exactitud.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de una de cada tres muestras para matriz efluente y aguas contaminadas. En el caso de aguas naturales se realiza un duplicado cada 5 muestras. En todos los casos al menos un duplicado por batch si el mismo presenta menor cantidad de muestras verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control correspondientes.

13.3. **Porcentaje de recuperación:**

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

Muestras sin dilución (DQO < 1000 mg O_2/L): se agrega como máximo 2,0mL de muestra + 0,5mL de la solución control de concentración aproximada a 1000 mgO_2/L (preparada al igual que la del estándar pero de preferencia a partir de otro lote de reactivos). La toma a realizar para la medición de muestra fortificada debe ser la misma que corresponde al análisis de muestra sin fortificar.

Muestras con dilución (DQO > 1000 mg O_2/L): se agregan 2,0mL de la dilución de la muestra + 0,5mL de la solución control de concentración aproximada a 1000 mgO_2/L.

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

Para matriz efluente y aguas contaminadas se fortifican todas las muestras, en el caso de aguas naturales se fortifica una muestra cada cinco. Si el batch fuera de menor cantidad, al menos una muestra fortificada por batch.

La fortificación debe estar dentro del rango de control 80 – 120 %, de lo contrario se debe repetir el análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Chemical Oxygen Demand (COD) 5220 A. Introduction y 5220 D. Closed Reflux, Colorimetric Method. Pp 543-544 y 547-548.

2010UY

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

Método espectrofotométrico

Elaborado - P. Simone

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

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

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de balanza analítica de resolución 0,0001 g (INE 15) o resolución 0,001 (INE115).

2.6. Instructivo de uso de destilador o desionizador de agua (INE109, INE121).

2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 22).

2.8. Ruta de análisis (RFQ 05).

2.9. Ruta de análisis para preparación de curva (RFQ 30).

2.10. Ruta para preparación de reactivos y soluciones estándar (RPR 12).

2.11. Ruta para preparación de solución control (RPS 18).

2.12. ES01 Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno se combinan con este pigmento catiónico, formando un complejo inmiscible en agua, el cual se extrae de la fase acuosa con cloroformo.

3.2. Este método es relativamente simple y preciso. Comprende tres extracciones sucesivas en cloroformo, seguido de un lavado y la medición de la intensidad del color azul del compuesto formado en un espectrofotómetro a 652 nm de longitud de onda. Se cuantifica a través de una curva de calibración.

3.3. El sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS – linear alkylbencene sulfonate) es el surfactante aniónico más ampliamente usado y se emplea para estandarizar el presente método; no es un compuesto simple, sino que comprende muchos isómeros y homólogos con estructura ($R´C_6H_4SO_3$)-Na^+, donde R´ es un grupo alquilo lineal secundario que posee entre 10 y 14 átomos de carbono de longitud. Los surfactantes de tipo sulfato y sulfonato responden ambos a esta metodología.

3.4. Los surfactantes aniónicos comúnmente empleados en la formulación de detergentes responden fuertemente al azul de metileno y estos incluyen surfactantes del sulfonato (RSO_3)-Na^+; del sulfato éster ($ROSO_3$)-Na^+; y surfactantes no iónicos sulfatados ($REnOSO_3$)-Na^+.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes, lentes de seguridad y máscara de protección de vapores orgánicos (3M 6006 Multi acid gas/organic vapor cartridge o similar).

4.2. Trabajar en campana de extracción de gases y manipular con precaución el cloroformo, dado que es tóxico, y carcinogénico por inhalación y contacto a través de la piel.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interferencias positivas resultan de todas otras sustancias sensibles al azul de metileno. Sustancias como los sulfonatos, sulfatos, carboxilatos, fenoles, tiocianatos inorgánicos, cianatos, nitratos y cloruros pueden transferir más o menos de azul de metileno a la fase de cloroformo. Las interferencias por cloruros se eliminan casi completamente y las de nitratos en gran medida, con el agua de lavado en la etapa de extracción.

5.2. Los detergentes catiónicos u otros componentes catiónicos como las aminas interfieren negativamente porque compiten por el azul de metileno en la formación de pares iónicos, con los detergentes aniónicos.

5.3. El material particulado interfiere negativamente porque algunos MBAS quedan adsorbidos en la superficie. Algunos MBAS se pueden desorber en las posteriores extracciones con $CHCl_3$, pero la recuperación será variable e incompleta.

5.4. Los sulfuros que suelen encontrarse en aguas residuales sin tratar o con sólo un tratamiento primario, pueden reaccionar con el azul de metileno formando un compuesto incoloro. Estas interferencias se eliminan agregando al inicio de la técnica peróxido de hidrógeno.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 Recolectar la muestra en recipiente de plástico (polietileno o equivalente) o en recipiente de vidrio, lavado sin detergente. El volumen típico de la muestra es de 1000 mL.

6.2 Mantenerla refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C), durante un período máximo de 48 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro para uso a 652 nm.

7.2. Embudos de decantación de 1000 mL y 250 mL, con tapón y válvula preferentemente de teflón.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g para la curva de calibración

7.4. Balanza de resolución 0.01 g para toma de muestras

7.5. Matraces aforados de 50,00 mL y 100,00 mL

7.6. Erlenmeyer de 1000 mL

7.7. Pipetas automáticas de volumen variable rango 1 - 10 mL

8. REACTIVOS

8.1. Solución stock LAS 1000 mg/L: pesar una cantidad de estándar de LAS de 1,00 g, en base activa. Disolver en agua, y diluir a 1000 mL; 1 mL = 1,00 mg LAS. Almacenar en la heladera, para disminuir la biodegradación. Si es necesario preparar semanalmente.

8.2. Solución estándar 10 mg/L: diluir 10,00 mL de la solución stock de LAS llevando a 1000 mL con agua desionizada. 1,00 mL = 10 µg LAS. Preparar diariamente.

8.3. Indicador fenolftaleína solución alcohólica: disolver 0,5 g de fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$ Nro. CAS 77-09-8) en 100 mL de etanol (CH_3CH_2OH Nro. CAS 64-17-5).

8.4. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 N: Agregar de a pocas porciones, 40 g de NaOH a 1000 mL de agua desionizada, con agitación constante.

8.5. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) 1 N y 6 N: prepararlos a partir del ácido sulfúrico concentrado, diluyendo con agua desionizada 36 y 6 veces respectivamente.

8.6. Cloroformo ($CHCl_3$ Nro. CAS 67-66-3).

8.7. Azul de metileno (AM $C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$ Nro. CAS 61-73-4): disolver 100 mg de AM en 100 mL de agua. Transferir 30 mL de esta solución a un matraz de 1000 mL. A 500 mL de agua, agregarle lentamente 41 mL de H_2SO_4 6 N y 50 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($NaH_2PO_4.H_2O$ Nro. CAS 10049-21-5) y mezclar. Diluir a 1000 mL.

8.8. Solución de lavado: agregar 41 mL de H_2SO_4 6N a 500 mL de agua desionizada en un matraz de 1000 mL de capacidad. Adicionar 50 g de Fosfato monosódico monohidrato ($NaH_2PO_4.H_2O$ Nro. CAS 10049-21-5), disolver por agitación y diluir con agua desionizada.

8.9. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2 Nro. CAS 7722-84-1) al 30 % v/v.

8.10. Lana de vidrio: lavarla con $CHCl_3$ para remover interferencias.

8.11. Agua desionizada o destilada (según ES01)

8.12. Alcohol isopropílico (C_3H_8O Nro. CAS 67-63-0).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una curva de calibración inicial de por lo menos cinco estándares más un blanco. El método es lineal en el rango de 0,023 a 2,0 mg/L de MBAS estándar, esto puede variar dependiendo del estándar que se utilice. Siempre que se demuestre la linealidad en el rango de interés, puede variarse el rango de concentración deseado (r^2= 0,995 o mayor). Si se cuenta con Material de Referencia Certificado (MRC), la curva puede realizarse con dicho material, asegurando la trazabilidad de la técnica.

10.2. Realizar las diluciones para crear la curva de calibración en cantidades que van desde 0 a 200 µg, considerando un punto cercano al Límite de Cuantificación del método. Realizando las tomas de solución estándar de LAS o MRC en Erlenmeyers. Adicionar suficiente agua para que el volumen total en cada embudo de decantación sea de 100 mL. Las tomas pueden realizarse en peso, considerando densidad 1 g/L. Trasvasar estas soluciones a los embudos de decantación de forma cuantitativa.

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

10.4. Medir la absorbancia a 652 nm; empleando como blanco $CHCl_3$.

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

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Toma de muestra:

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

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

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

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

11.2. Colocar el volumen de muestra preestablecido en el embudo de decantación de 1000 mL, llevar a medio alcalino con NaOH 1 N hasta viraje de color de la solución a rosado, usando unas gotas de fenolftaleína como indicador. Agregar $HzSO_4$ 1 N hasta que desaparezca el color rosado.

11.3. Agregar 10 mL $CHCl_3$ y 25 mL de azul de metileno. Agitar vigorosamente por 30 segundos y dejar que se separen las fases. Agitación excesiva puede causar formación de emulsión. Si se forma emulsión persistente agregar alcohol isopropílico en una cantidad menor a 10 mL y agregarle el mismo volumen a todos los estándares.

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

11.5. Antes de separar la capa de $CHCl_3$, mover suavemente y luego dejar reposar.

11.6. Descargar la capa de $CHCl_3$ en otro embudo de decantación de 250 mL de capacidad. Repetir la extracción 2 veces más usando 10 mL de $CHCl_3$ cada vez. Si el color azul en la fase acuosa desaparece se recomienda; descartar la muestra y usar un volumen menor.

11.7. Juntar todos los extractos de $CHCl_3$ en el 2º embudo de decantación. Agregar 50 mL de solución de lavado, agitar vigorosamente 30 segundos.

11.8. Mover suavemente y luego dejar reposar. Descargar la capa de $CHCl_3$ a través de un embudo con un filtro de lana de vidrio a un matraz aforado de 50 mL. El filtrado debe ser límpido.

11.9. Agregar dos tandas de 10 mL de $CHCl_3$ a la solución de lavado que se encuentra en el embudo de decantación de 250 mL, filtrar y juntarlas con el resto de cloroformo.

11.10. Lavar embudo y lana de vidrio con $CHCl_3$, que se junta con lo demás. Enrasar a volumen 50 mL.

Nota 1: debido a que el cloroformo es volátil, la suma de todos los volúmenes recogidos no excede los 50 mL.

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

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Graficar la absorbancia leída para cada estándar en función de los µg de LAS tomados para cada punto de la curva según:

$$\mu g\ LAS_{\ estándar} = T \times C_{LAS}$$

donde:

T: corresponde a la toma del estándar

CLAS: corresponde a la concentración de la solución estándar LAS de 10 mg/L o MRC

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

$$Abs_{\ estándar} = a \times (\mu g\ LAS_{\ estándar}) + b$$

donde:

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

12.2. Los µg de LAS correspondientes a la absorbancia de muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$\mu g\ LAS_{\ muestra} = \frac{Abs_{\ muestra} - b}{a}$$

12.3. A partir de los µg de LAS, correspondientes a la absorbancia leída de la muestra calcular:

$$mg\ MBAS/L = \frac{\mu g\ de\ LAS_{\ muestra}}{T\ muestra}$$

donde:

Tmuestra: el volumen de muestra tomado para la extracción en mL

Se debe informar “MBAS, calculada con LAS de peso molecular 318 g/mol

Nota 2: En caso de haber utilizado un estándar o MRC de LAS de peso molecular diferente a 318 g/mol, realizar la corrección correspondiente.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Chequeo de la curva de calibración:** Realizar el chequeo diario de la curva de calibración con soluciones control, una de concentración cercana al Límite de Cuantificación, y la otra de concentración superior a la esperada de las muestras. Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico para preparación de la solución control. El resultado de la solución control de menor concentración se considerará aceptable si se encuentra dentro de un 25 % del valor original, mientras que el valor para la solución control de mayor concentración, no puede apartarse más allá de un 10 % del valor original. Si se superan estos límites preparar una nueva curva de calibración.

13.2. **Precisión:** Las muestras de aguas tratadas, aguas residuales domésticas e industriales se analizarán por duplicado una de cada tres, o por lo menos un duplicado en el batch. Verificar que la dispersión de los duplicados este dentro de los límites del gráfico de control, aceptando un valor del 15% hasta tener los gráficos de control correspondientes. Para aguas naturales analizar una muestra por duplicado cada cinco o mínimo una por batch cuando la cantidad de muestras es menor.

13.3. **Exactitud como porcentaje de recuperación de fortificación:** Las muestras de aguas tratadas, aguas residuales domésticas e industriales se deberán fortificar. Verificar que el porcentaje de recuperación este dentro de los límites de control, aceptando un apartamiento del 20%, hasta obtener los gráficos correspondientes.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 5540 Surfactants, 5540A Introduction, 5540C Anionic Surfactants as MBAS, pp. 58 2- 583 y 585 - 588.

2011UY

Determinación de Demanda Química de Oxígeno mediante kit (Machery Nagel) de bajas concentraciones en aguas naturales, aguas contaminadas y efluentes líquidos

Método espectrofotométrico, reflujo cerrado

Elaborado - R. Gálvez

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, aguas contaminadas y efluentes industriales.

El límite de detección es 6,4 mgO_2/L, y el límite de cuantificación es 19 mgO_2/L.

El rango de trabajo queda determinado entre 19 y 150 mgO_2/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del digestor (INE 105).

2.6. Instructivo de uso de balanzas con resolución 0.01 g y 0.001 g (INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 115).

2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 106, INE 146).

2.8. Instructivo de uso de destilador y desionizador (INE 121, INE 109).

2.9. Ruta de análisis (RFQ 38).

2.10. Ruta de Curva DQO (RFQ 48).

2.11. Registro de preparación de soluciones control (RPS 01).

2.12. Registro de preparación de reactivos y estándares (RPR 01).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La demanda química de oxígeno (DQO) es la medida de oxígeno equivalente a la materia orgánica que es susceptible a ser oxidada por un oxidante químico específico fuerte, en condiciones específicas de temperatura y tiempo. La cantidad de oxidante consumido se expresa en términos de su equivalencia de oxígeno.

3.2. Los componentes tanto orgánicos como inorgánicos de la muestra son pasibles de oxidación, pero en la mayoría de los casos predominan los componentes orgánicos y son de mayor interés.

3.3. La demanda química de oxígeno es un ensayo definido, el alcance en cuanto a la oxidación de la muestra puede ser afectada por el tiempo de digestión, la fuerza del reactivo y la concentración de DQO que posee la muestra.

3.4. La muestra se oxida con una cantidad conocida de dicromato de potasio en exceso, en medio ácido y en presencia de catalizadores a 150 °C ± 2 °C, en un sistema cerrado. En el caso de la determinación de DQO para concentraciones menores a 150 mgO_2/L, se determina espectrofotométricamente la disminución del dicromato inicial a 436 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y lentes de seguridad. Empleo de campana de extracción para alojar el digestor.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. Si bien las soluciones de dicromato y ácido sulfúrico se porporcionan en el kit ya preparadas y fraccionadas, se debe tener especial cuidado con la solución de dicromato de potasio: dicha solución contiene además del dicromato que es tóxico, una sal de mercurio que es extremadamente tóxica por contacto con la piel y los ojos. La solución de ácido sulfúrico también puede causar quemaduras por contacto con los ojos y la piel.

5. INTERFERENCIAS

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

5.2. La interferencia más común es el ion cloruro. El cloruro reacciona con el ion plata para precipitar cloruro de plata, y esto inhibe la acción catalítica de la plata. Bromuro, yoduro y cualquier otro reactivo que inactive el ion plata puede interferir de forma similar.

5.3. Los iones inorgánicos reducidos tales como: hierro ferroso, sulfuro, magnesio, manganeso, etc. son oxidados cuantitativamente bajo las condiciones de análisis. Para muestras conteniendo niveles significativos de estos iones, suponiendo que se oxidan estequiométricamente, y conociendo su concentración inicial se obtiene el valor de la DQO por medio de correcciones.

5.4. Los compuestos alifáticos volátiles de cadena larga no son oxidados, porque al volatilizarse no toman contacto con la solución oxidante.

5.5. Si la muestra es preservada con ácido sulfúrico concentrado y es utilizada para relacionarla con DBO o TOC, verificar que todas las determinaciones sean realizadas en las mismas condiciones.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico, un volumen mínimo de 100mL sin cámara de aire. Refrigerar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Analizar dentro de las 24 h de extraída la muestra. En caso de necesitar preservar la muestra, llevar a pH < 2 con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y refrigerar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C); teniendo en este caso 28 días para analizar la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro con longitud de onda de 436nm.

7.2. Digestor: block de aluminio con huecos circulares, para alojar tubos de 16 mm de diámetro, que opere a 150 °C ± 2 °C. Los tubos deben poder ingresar y ser extraídos de los huecos fácilmente, para evitar que sean rayados.

7.3. Tubos de digestión de kit: tubos con los reactivos de borosilicato con tapa de rosca resistente al calor y contratapa de teflón, de 7,5mL de capacidad y 16 mm de diámetro externo. Asegurar que los tubos utilizados como celdas de lectura posean buena calidad óptica.

7.4. Matraces aforados de 500mL.

7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (1-10mL) y punteros correspondientes.

7.6. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000µL) y punteros correspondientes.

7.7. Balanza de resolución 0,01g.

7.8. Balanza de resolución 0,0001g.

7.9. Destilador de agua.

7.10. Desionizador de agua.

7.11. Campana de extracción.

8. REACTIVOS

8.1. Solución estándar de ftalato ácido de potasio, 1000 mg O_2/L: secar ftalato ácido de potasio (KHP Nro. CAS 877-24-7) a 110 °C hasta peso constante. Disolver 425 mg en agua destilada o grado superior y diluir a 500 mL en matraz aforado. Conservar la solución refrigerada a ≤6 °C (> 0 °C). Esta solución es estable por una semana. En caso de observar alteración de la solución, descartar.

8.2. Agua destilada (según ES 01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

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

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Curva de calibración: Realizar una dilución de la solución estándar para obtener una concentración de 150 mg O_2/L aproximadamente. Realizar una curva de calibración de por lo menos 7 diluciones del estándar, incluyendo un blanco y el límite de cuantificación y que abarque todo el rango de trabajo; completando a un volumen final de 2,0 mL con agua.

10.2. Tapar los tubos y agitarlos en forma circular, manteniéndolos en posición vertical.

10.3. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C ± 2 °C durante 2 horas.

10.4. Enfriar los tubos a temperatura ambiente.

10.5. Blancos: utilizar un blanco sin digerir como solución de referencia; y compararlo con el blanco digerido para confirmar la reacción analítica correcta y para determinar el blanco del método (se acepta un 10 % de apartamiento).

10.6. Limpiar los tubos con papel y alcohol antes de medir en el espectrofotómetro. La gradilla debe ser adecuada para no deteriorar la calidad del vidrio de los tubos, ya que se usan como celda en el espectrofotómetro.

10.7. Realizar el ajuste de cero del equipo a 436nm con un tubo conteniendo agua destilada en el porta celda.

10.8. Leer la absorbancia a 436nm.

10.9. Graficar la absorbancia leída en función de la concentración del estándar mgO_2/L.

Nota 1: La calibración del método es realizada una vez al año, o cuando se utiliza un nuevo lote de tubos de digestión de kit o cada vez que un control de exactitud no se encuentre dentro del rango de los límites aceptados; (ver 13.1), lo que se cumpla primero.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Homogenizar la muestra. Tomar 2,0 mL de muestra y colocarlo en el tubo (kit). Tapar bien el tubo y agitar vigorosamente en forma circular, manteniéndolo en posición vertical

11.2. Colocar los tubos en el digestor a 150 °C ± 2 °C durante 2 horas.

Nota 2: Las muestras y la solución control deben ser digeridas simultáneamente en las mismas condiciones.

12. ANÁLISIS DE DATOS

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

$$Abs_{estándar} = a \times C + b$$

Dónde:

a: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

b: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

C: corresponde a la concentración en mg O_2/L

12.2. La concentración de DQO se calcula según la siguiente ecuación:

$$DQO\left(\frac{mgO_2}{L}\right) = \frac{Abs_{muestra} - b}{a}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Realizar una dilución de la solución control preparada según Manual de Control de Calidad analítico, para obtener una solución de aproximadamente 50 mgO_2/L. Realizar por lo menos un control de exactitud por batch de muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites aceptados, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis. Si no se encuentra causa aparente, se deberá preparar nueva curva de calibración.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras de industrias y de una de cada tres muestras de aguas, y por lo menos un duplicado por batch. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control correspondientes.

13.3. **Porcentaje de recuperación:**

Fortificación: Se agrega a la toma de muestra 0,15mL de la solución control de concentración aproximada a 1000mgO_2/L. El porcentaje de recuperación de la adición de una alícuota de solución estándar se realiza en todas las muestras de industrias y en una de cada cinco muestras de aguas que se analicen, siempre como mínimo una fortificación por batch. La fortificación debe estar dentro del rango de control correspondiente, de lo contrario, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Chemical Oxygen Demand (COD) 5220 A. Introduction y 5220 D. Closed Reflux, Colorimetric Method. Pp 543-544 y 547-548.

14.2. Manual del kit Macherey-Nagel. Metodología equivalente a los métodos EPA 410.4, APHA 5220 D, DIN ISO 15705-H45 y DIN 38409-H41-1.

2012UY

Determinación de detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno en Aguas y Efluentes (Kit)

Método espectrofotométrico

Elaborado - S. Malacre

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Este procedimiento se utiliza para la determinación de detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno en aguas naturales o tratadas y en aguas residuales domésticas e industriales mediante el uso de un kit; en un rango lineal de 0,23 a 3,86 mg/L de LAS de peso molecular 318 g/mol. En caso de ser necesario, es posible realizar una dilución de la muestra de hasta 10 veces.

El límite de detección es de 0,047 mg/L de LAS.

El método es aplicable también al análisis de aguas marinas tras dilución de 1 parte de muestra y 19 de agua (ES01) de acuerdo a especificaciones del kit.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso Balanza analítica de resolución 0,001 o resolución 0,0001 (INE 115 – INE15).

2.6. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 146).

2.7. Ruta de análisis (RFQ 43).

2.8. Ruta de análisis para preparación de Curva (RFQ 42).

2.9. Instructivo de uso medidor electroquímico módulo pH (INE 98).

2.10. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121).

2.11. Preparación de solución Control (RPS18).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los detergentes aniónicos sensibles al azul de metileno se combinan con este pigmento catiónico, formando un complejo inmiscible en agua, el cual se extrae de la fase acuosa con cloroformo.

3.2. Este método es relativamente simple y preciso. Comprende una extracción en cloroformo, y la medición de la intensidad del color azul del compuesto formado en la fase orgánica en un espectrofotómetro a 620 nm de longitud de onda. Se cuantifica a través de una curva de calibración.

3.3. El dodecilsulfato sódico (SDS o NaDS), también conocido como laurilsulfato sódico (LS), es un compuesto tensoactivo aniónico y se emplea para estandarizar el presente método; es un compuesto orgánico sintético con la fórmula $CH_3(CH_2)_{11}SO_4Na$; la molécula posee una cadena de 12 átomos de carbono, adosada a un grupo sulfato, dotando a la molécula de las propiedades anfifílicas. Los surfactantes de tipo sulfato y sulfonato responden ambos a esta metodología.

3.4. Los surfactantes aniónicos comúnmente empleados en la formulación de detergentes responden fuertemente al azul de metileno y estos incluyen surfactantes del sulfonato ($RSO_3^-Na^+$; del sulfato éster ($ROSO_3^-Na^+$; y surfactantes no iónicos sulfatados ($REnOSO_3^-Na^+$.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes, lentes de seguridad y máscara para vapores orgánicos. En forma alternativa al empleo de máscara, trabajar en campana de extracción.

4.2. Se recomienda manipular con precaución ya que el cloroformo que contienen los tubos del kit es tóxico y carcinogénico por inhalación y contacto a través de la piel.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interferencias positivas resultan de todas las otras sustancias sensibles al azul de metileno. Sustancias como los sulfonatos, sulfatos, carboxilatos, fenoles, tiocianatos inorgánicos, cianatos, nitratos y cloruros pueden transferir más o menos de azul de metileno a la fase de cloroformo. La muestra no sufre alteraciones si las siguientes concentraciones (mg/L) de sustancias extrañas no superan los valores indicados:

- Fe^{3+}: < 20
- Cr^{3+}, Cr^{6+}: < 50
- Al^{3+}, NO_3^{2-}: < 100
- Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, NO^{2-}: < 200
- NH_4^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cl^{-}: < 500
- PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, K^{+}, Na^{+}: < 1000

No se ha comprobado el efecto adicionado de distintos iones de interferencia.

5.2. Los detergentes catiónicos interfieren negativamente debido a que forman pares iónicos con los detergentes aniónicos impidiendo que estos últimos sean detectados, ya que sustituye la formación de los pares iónicos entre los detergentes aniónicos y azul de metileno.

5.3. El material particulado interfiere negativamente porque algunos MBAS quedan adsorbidos en la superficie por lo que pueden ser retenidos en la fase acuosa.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en recipiente de plástico (polietileno o polipropileno) o en recipiente de vidrio. Lavado sin detergente. Mantenerla refrigerada a una temperatura > 0ºC y ≤ 6ºC. El volumen típico de la muestra es de 250 mL.

6.2. El tiempo máximo para realizar el análisis posterior a su recolección es de 48 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,001g (Uso: preparación de curva de calibración, dilución de muestras).

7.2. Matraces

7.3. Pipetas automáticas de volumen variable rango 1 a 10 mL

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable rango 100 a 1000 µL

7.5. Espectrofotómetro para uso a 620 nm

7.6. Medidor electroquímico módulo pH

7.7. Destilador o desionizador de agua

Nota 1: todo el material que se utilice debe lavarse sin detergente.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada o calidad superior (según ES 01).

8.2. Solución de Lauril Sulfato (LS): Se utiliza material de referencia vigente o material de referencia Certificado (MRC), y se realizan las diluciones pertinentes para la realización de la curva de calibración.

8.3. Solución control de 1000 mg LS/L: la misma se prepara de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del Laboratorio de la DINACEA.

8.4. Dilución de 10 mg LS/L de la Solución Control: se toma 1 g de la Solución Control de 1000 mg LS/L (8.3) y se lleva a un peso final de 100 g en balanza de resolución 0,001g. Para su utilización se realizará la dilución correspondiente. Se prepara diariamente.

Nota 2: Se asume densidad de 1 g/mL para todas las tomas.

Contenido del kit:

8.5. Tubos de test con 6 mL de Tensoactivos aniónicos 4 (R0 + R1), los cuales contienen una mezcla de metanol, cloroformo, agua y solución tampón fosfórico.

8.6. Tubo de test con 11 mL de Tensoactivos aniónicos 4 (R2), el cual contiene una mezcla de azul de metileno y ácido sulfúrico diluido (<5%).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la formación de espuma en soluciones que contengan surfactante, debido a que si se forma, se obtiene una concentración heterogénea en la interfase gas-líquido.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una curva de calibración de al menos 5 puntos más un blanco, donde sea incluido el límite de cuantificación, a partir de la solución (8.2). Se asume densidad de 1g/mL para todas las tomas. Registrar en RFQ 42.

10.2. Añadir 4,0 mL de solución de la curva a un tubo de test.

10.3. Añadir 500 µL de R2, cerrar y agitar vigorosamente durante 1 min.

10.4. Esperar por lo menos 10 minutos (visualizar separación de fases).

10.5. Limpiar el tubo de test por la parte exterior.

10.6. Medir la absorbancia a 620 nm; empleando como blanco de lectura de celda un tubo de test R0+R1 sin uso el cual contiene cloroformo ($CHCl_3$) en su fase inferior.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. La muestra debe tener un pH entre 4 y 9, en caso de requerir un ajuste, realizarlo previo a su análisis.

11.2. De ser necesario se realiza una dilución previa de la muestra en balanza de resolución 0,001g. Registrar en RFQ 43.

11.3. Realizar una toma de 4,0 mL de la muestra a analizar o dilución pertinente con pipeta automática, y colocarla en el tubo de test R0+R1.

11.4. Repetir los pasos 10.3. a 10.5.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Curva de calibración:

Graficar la absorbancia leída para cada estándar en función de los mgLS/L tomados para cada punto de la curva según:

$$mgLS/_L = \frac{C_{Estándar} \times T}{M_f}$$

Dónde:

Cestandar es la concentración de la solución estándar en mgLS/L

T es la toma de solución estándar en g

M_f es la masa de solución final en g

La curva de calibración está representada por la siguiente recta:

$$Abs_{Estándar} = a \times \frac{mgLS_{Estándar}}{L} + b$$

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

12.2. Los mgLS/L correspondientes a la absorbancia de muestra se calculan según la siguiente ecuación:

$$mgLS_{muestra}/L = \frac{(Abs_{muestra} - b)}{a} \times FD$$

Dónde: $FD = \frac{masa\ final\ (g)}{toma\ muestra\ (g)}$ (asumiendo densidad 1g/mL)

12.3. Se debe informar MBAS, calculada como LAS de peso molecular (PM) 318 g/mol, en caso de haber utilizado un estándar o MRC de un compuesto tensoactivo aniónico de peso molecular diferente, por ejemplo LS , realizar la corrección:

$$mgLAS_{muestra}/L = \frac{\left(mgLS_{muestra}/_{L}\right)}{PM_{LS}} \times PM_{LAS}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Curva de calibración:** para esta técnica, la curva de calibración debe ser realizada por única vez, y verificada con controles de exactitud.

Frente al cambio de reactivos (lote del kit), o algún cambio significativo en equipos, la curva debería ser realizada nuevamente.

13.2. **Control de exactitud:** Para la vigencia de la curva de calibración; realizar dos diluciones de la solución (8.4), en todos los batch de muestras:

a) En el límite de cuantificación

b) En la concentración esperada de las muestras (1 mg LAS/L aprox.)

Analizar los controles siendo aceptable un 25% de apartamiento del valor original, hasta que se cuente con suficiente información para construir los gráficos de control correspondientes.

Si el resultado está fuera de control para alguno de los dos casos, revisar el procedimiento, y proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Control de precisión:** Realizar un duplicado cada 3 muestras de aguas residuales, domésticas e industriales, y una de cada 5 muestras de aguas naturales o tratadas. Verificar que la dispersión de los duplicados este dentro de ± 10 % rango normalizado hasta contar con los límites del gráfico de control correspondiente. En caso de que algún resultado se encuentre fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.4. **Porcentaje de recuperación de fortificación:** Realizar un fortificado cada 3 muestras de aguas residuales y domésticas e industriales, y cada 5 muestras de aguas naturales o tratadas. Utilizar para la fortificación 0,8 mL de la dilución de 10mg/L de la solución control (8.4). Llevar a volumen final 10 mL de la muestra fortificada (o dilución fortificada cuando corresponda).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 5540 Surfactants, 5540A Introduction, 5540C Anionic Surfactants as MBAS, pp. 582 a 583 y 585 a 588.

14.2. Detergentes aniónicos (tensoactivos aniónicos) REF 985032. Test 0-32 NANOCOLOR 07.17.

SECCIÓN 3
Metálicos

3123UY

Determinación de Aluminio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de aluminio (Al) en aguas naturales, digeridas o no, y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 2,0 mg/L a 70,0 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY)

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 309,3 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de aluminio se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

5.3. La interferencia causada por ionización del analito en llama se minimiza por agregado de un exceso de una sal de potasio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en bolsa de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 5 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de aluminio.

7.3. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.4. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de aluminio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 39435 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de aluminio metálico de alta pureza en 100 mL de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) calidad para análisis trazas (1 + 1) caliente y diluir a 1 L en matraz aforado. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de aluminio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de aluminio soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 39435 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de aluminio o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

8.10. Óxido nitroso de alta pureza (N_2O Nro. CAS 10024-97-2) calidad mínima 99 %.

8.11. Solución de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7): disolver 25 g de KCl calidad PA en 100 mL de agua desionizada.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

Proteger de superficies metálicas hechas en aluminio, como ser estantes de estufas, canastos de secado, bandejas, papel aluminio, etc.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de aluminio, más un cero, por peso utilizando la balanza 7.3, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo ácido nítrico, agua y solución de potasio tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v y 2 % v/v la solución de cloruro de potasio. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Aluminio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, aproximadamente en el rango medio de la escala de la medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra). Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de aluminio en el filtrado.

Antes de la determinación agregar 2 mL de solución de cloruro de potasio cada 100 mL de nuestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir; en éste último caso solo de ser necesario, pesando lo que descarga una pipeta calibrada (pesando con balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin). Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberán realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de aluminio.

Longitud de onda: 309,3 nm Ancho de rendija: 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

11.6. Conectar el Combustible: acetileno.

Conectar el Oxidante: óxido nitroso.

Tipo de llama: (flujo de acetileno 6,6 L/min, flujo de óxido nitroso 11,0 L/min).

Altura del quemador: 11 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla, ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante – atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración, dentro del rango lineal como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 y potasio, tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 2 % v/v en potasio, en tubo de plástico. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de aluminio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Al/L)} = C_s \times T_s / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_s: corresponde a la concentración de aluminio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_s: corresponde a la toma en g del estándar utilizado.

M_T: corresponde a la masa total en g del estándar utilizado, más el ácido nítrico, potasio y agua.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_s: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = mx + b$$

12.3. Se determina la concentración de aluminio en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de la misma, interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2.)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: los coeficientes de la curva

A: la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de aluminio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Aluminio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

CM: corresponde a la concentración de Al calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y $_2$: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras límpidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{Mf/d_{dig}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$ds_{\text{in dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{Pf}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cloruro de potasio y agua si corresponde).

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 6: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Aluminio total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Al calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf: corresponde a la masa final del digesto en g.

TM: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de aluminio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Al\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Al\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Al\ M\ AD}$: Concentración de Al calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{Al\ M}$: Concentración de Al, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: Toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: Concentración de aluminio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 5 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 u 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.3 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90 - 110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente. Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son del 90 - 110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de aluminio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir en análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rangos normalizados.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un 10 % para matrices líquidas, y 20 % para matrices sólidas.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3127UY

Determinación de Bario en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de bario (Ba) en aguas naturales, digeridas o no, y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.) en el rango de 1,0 a 50 mg/L. Es posible ampliar el rango de medida por concentración o dilución de la muestra. Eventualmente se puede girar el quemador, disminuyendo así la sensibilidad analítica y ampliar así el límite superior de concentración. Para algunas matrices, estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY)

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 553,5 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de bario se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.

5.3. La interferencia causada por ionización de los analitos en llama se minimiza por agregado de un gran exceso de una sal de potasio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.

Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0°C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 5 cm de longitud. (SHIMADZU, AA7000 con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de bario.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico complatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 % v/v: solución 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 % v/v: solución 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de bario: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 51994 90092 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,437 g de carbonato de bario ($BaCO_3$ Nro. CAS 513-77-9) de alta pureza en un volumen mínimo de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) de calidad para análisis de trazas (1 + 1) y diluir a 1 L en matraz aforado con ácido clorhídrico 1 %. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 51994 90092 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de carbonato de bario, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente

8.8. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

8.9. Oxido nitroso de alta pureza (N_2O Nro. CAS 10024-97-2), calidad mínima 99 %.

8.10. Solución de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7), disolver 25 g de KCl calidad PA en 100 mL de agua desionizada.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre que aparece subrayado.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de bario, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo ácido nítrico, agua y solución de potasio tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v y 2 % v/v la solución de potasio. Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de bario en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6 ó 8.7., aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/ Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de bario en el filtrado.

11.2. Previo a la determinación en el espectrofotómetro agregar 2 mL de solución de cloruro de potasio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.3. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.4. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.5. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91)

11.6. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de bario.

Longitud de onda: 553,5 nm, ancho de rendija: 0,2 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).

Conectar el Combustible: acetileno.

Conectar el Oxidante: óxido nitroso.

Tipo de llama: de óxido nitroso (flujo de acetileno 7,0 L/min, flujo de óxido nitroso 11,0 L/min).

Altura del quemador: 11 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.7. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante – atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.8. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.9. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3., con agua 8.2 y ácido nítrico y potasio, tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 2 % v/v en potasio, en tubo de plástico. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.10. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.11. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de bario de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración C (mg Ba/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de bario, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T: corresponde a la masa total del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua, en g.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) de valor conocido en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el estectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m\,x + b$$

12.3. Se determina la concentración de bario en la digestión de la muestra (CM) o en una dilución de la misma, interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2.).

donde:

m y b: los coeficientes de la curva.

A: la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de bario total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Bario total, mg/L} = (CM \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Ba calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y $_2$: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras límpidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{Mf/d_{dig}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$ds_{\text{in dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2:

$$FD_2 = \frac{Pf}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cloruro de potasio y agua si corresponde).

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 6: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Bario total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Ba calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco (ver punto 13.5.), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de bario en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación Ba} = 100 \times ((C_{Ba\ M\ AD} \times V_{MAD} - C_{Ba\ M} \times (V_{MAD} - T_{AD}))) \times d_{EST} / (T_{AD} \times C_{EST} \times d_{DM})$$

donde:

$C_{Ba\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Ba, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Ba\ M}$: corresponde a la concentración de Ba , calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de bario del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de estándar adicionado más muestra, en g.

d_{DM}: corresponde a la densidad de la digestión de la muestra medida en 11.1, calculada como el cociente entre la masa que descarga. la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_{EST}: corresponde a la densidad del estándar adicionado (8.6 ó 8.7) de valor conocido (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son del 90 -110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de bario obtenido debe estar en el rango 70 -130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70 -130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir en análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3128UY

Determinación de Cadmio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cadmio (Cd) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,001 a 20 mg/L para aguas naturales y 0,03 a 20 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,0002 mg/L para aguas naturales y de 0,006 mg/L para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 228,8 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de cadmio se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, guantes y túnica.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0°C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de cadmio.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cadmio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 51994 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de cadmio metálico (PA) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 37 % de calidad PA de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cadmio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de cadmio soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 51994 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cadmio o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cadmio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cadmio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según procedimiento 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico 20%, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cadmio en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidos, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de cadmio.

Longitud de onda: 228,8 nm, ancho de rendija 0,7nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el Combustible: acetileno.

Conectar el Oxidante: aire.

Tipo de llama: (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min).

Altura del quemador: 7 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cadmio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Cd/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST}/d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de cadmio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T: corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el estectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x).

$$y = m\,x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

Rango 1	0,02 – 0,3 mg/L
Rango 2	0,3 – 1 mg/L

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de cadmio en la digestión de la muestra (CM), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A-b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de cadmio total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cadmio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Cd calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: Solo si fuera necesario diluir la muestra:

$$FD_2 = \frac{P_f/d_f}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cadmio total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Cd calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de cadmio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\ \text{de Recuperación} = 100 \times [(C_{Cd\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Cd\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Cd\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Cd calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Cd\ M}$: corresponde a la concentración de Cd, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de cadmio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruída y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente. Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son del 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cadmio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absorption spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3129UY

Determinación de Calcio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de calcio (Ca) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,05 a 7 mg/L para la llama de óxido nitroso/acetileno y de 0,4 a 50 mg/L para la llama aire/acetileno. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 08, RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc), se determina calcio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 µm. Otros tipos de muestras son digeridas según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. El metal se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 422,7 nm. El contenido de calcio se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica, guantes apropiados.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistentes a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.

5.3. La presencia de fosfato interfiere en la determinación por formación de complejos de calcio, no atomizables en la llama de aire/acetileno, esta interferencia se elimina por agregado de lantano quien forma un complejo con fosfato de mayor estabilidad liberando así el calcio. Dicha interferencia también puede ser eliminada por el uso de la llama de óxido nitroso/acetileno teniendo en cuenta que en este caso se debe agregar una sal de cesio para inhibir la ionización del calcio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Dejar cámara de aire de 20 mL aproximadamente. Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de calcio.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

7.9. Quemador de 5 cm para medida con llama de óxido nitroso / acetileno.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de calcio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert® 69349 equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 0,2497 g de carbonato de calcio ($CaCO_3$ Nro. CAS 471-34-1 PA, secado a 180 °C una hora antes de pesarlo) en agua y diluir a 100 mL en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de calcio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO^3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de calcio, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert® 69349 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de carbonato de calcio o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.

8.10. Óxido nitroso alta pureza (N_2O Nro. CAS 10024-97-2), 99 %.

8.11. Solución de lantano, disolver 58,65 g de óxido de lantano (La_2O_3 Nro. CAS 1312-81-8 calidad PA) en Erlenmeyer en 250 mL de ácido clorhídrico 37 % (HCl Nro. CAS 7647-01-0 calidad para análisis de trazas metálicas) hasta disolución total, diluir a 1 L con agua desionizada.

8.12. Solución de cloruro de cesio (CsCl Nro. CAS 7647-17-8), disolver 25 g de CsCl calidad PA en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de calcio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de lantano o 10 % v/v la solución de cesio. (En caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico). Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 08). Calcular la concentración de calcio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar el efecto de la matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión / Tratamiento de la muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total, las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de calcio en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de la muestra líquida previo a digerir, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1 mL. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final sea de 10 % v/v para el caso de usar la solución de lantano o 10 % v/v en caso de usar la solución de cesio. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de exactitud.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de calcio.

Longitud de onda: 422,7 nm. Ancho rendija: 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).

Conectar el Combustible: acetileno.

Conectar el Oxidante: aire u óxido nitroso.

Tipo de llama: Aire (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min). Altura quemador de 10 cm: 7 mm.

Óxido nitroso (flujo de acetileno 6,5 L/min, flujo de óxido nitroso 11,0 L/min). Altura quemador de 5 cm: 11 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla, ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante - atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema, verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico, otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras, medir un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra en tubo de plástico por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, ácido nítrico, lantano o cesio, según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % v/v para cesio o 10 % v/v para lantano y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Determinar las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 3: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANALISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de calcio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Ca/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de calcio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o estándares intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T: corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua más lantano o cesio.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar medida en 10.1 calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración, graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada y uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de calcio en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma, interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares.

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de calcio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Calcio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a concentración de Ca calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco siempre que sea necesario (13.5.) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f / d_{dig}}{T_M / d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f: corresponde a masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL) muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. **Cálculo de FD_2:**

$$FD_2 = \frac{P_f/d_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio o lantano, según corresponda y agua).

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma.

Nota 4: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. **Para muestras sólidas:**

$$\text{Calcio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Ca calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. **Se determina la concentración de calcio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:**

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Ca\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Ca\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Ca\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Ca calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Ca\ M}$: corresponde a la concentración de Ca, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de calcio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL

Nota 5: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son del 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de calcio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70 -130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction; 3111 B Direct Air-acetylene flame method y 3111 D Direct Nitrous Oxide – Acetylene Flame Method 201 a 206 y 208 a 209.

14.3. SHIMAZDU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.

3133UY

Determinación de Cinc en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cinc (Zn) en aguas, aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,003 a 10 mg/L para aguas naturales y 0,2 a 10 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,001 mg/L para aguas naturales y de 0,05 mg/L para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY)

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total, la muestra es digerida, según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 213,9 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de cinc se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2. Utilizar corrección de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, con filtro de policarbonato o de ésteres de celulosa, con tamaño de poro de 0,45 µm. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para muestras sólidas, preservar en heladera hasta el análisis. En ambos casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000 INE91).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de cinc.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado (HNO_{3CC}) al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cinc: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 18827 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente: disolver 1,000 g de cinc metálico (Zn Nro. CAS 7440-66-6) (PA) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 37 % de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz forado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cinc: dicha solución se prepara por peso en balanza 7.4, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de Cinc, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 18827 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondeinte. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de cinc, o utilizar un estándar multielementeal Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previas a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cinc, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cinc en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cinc en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con la balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el instituto Metrológico o un laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidos, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de cinc.

Longitud de onda: 213,9 nm, ancho de rendija 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91, tiempo de estabilización de la lámpara mínimo 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el combustible: acetileno alta pureza.

Conectar el oxidante: aire.

Tipo de llama: Aire –Acetileno (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min).

Altura del quemador: 7 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla, ajustar la posición del quemador con el dispositivo de adelante-atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo). De persistir el problema ajustar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3, con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde). Alternativamente girar el quemador y volver a empezar con la lectura de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cinc de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Zn/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de Cinc, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T: corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m\,x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en el rango:

Rango 1 0,04 – 0,5 mg/L

Nota 5: Debido a la relación entre la señal proporcionada por el equipo y la concentración del analito, es posible utilizar una curva de calibración de exponencial de orden dos.

12.3. Se determina la concentración de cinc en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2).

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de cinc total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cinc total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Zn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponden a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Calculo de FD_2: solo si fuera necesario diluir la muestra

$$FD_2 = \frac{P_f}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 6: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cinc total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Zn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, previo al cálculo a partir de la curva de calibración, ver punto 13.5,

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de Cinc en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Zn\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Zn\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Zn\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Zn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{Zn\ M}$: corresponde a la Concentración de Zn, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de Cinc del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son del 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cinc obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. Si existe gráfico de control, los límites quedarán fijados por éste. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1.Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2.American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3134UY

Determinación de Cobre en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cobre (Cu) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,004 a 60 mg/L para aguas naturales y 0,07 a 60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

El límite de detección es de 0,001 mg/L para aguas naturales y 0,01 mg/L para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 324,8 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de cobre se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácido.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En ambos casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de cadmio.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro.

Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cobre: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 38996 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente: disolver 1,000 g de cobre metálico (Cu Nro. CAS 7440-50-8) (PA) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 37% de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cobre: dicha solución se prepara por peso en balanza 7.4, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de cobre soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 38996 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cobre metálico o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cobre, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cobre en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según procedimiento 3276UY

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cobre en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de la muestra líquida previa a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada. por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin Registrar en la ruta correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidos, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de cobre.

Longitud de onda: 324,8 nm, ancho de rendija 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el combustible: acetileno alta pureza.

Conectar el oxidante: aire.

Tipo de llama: (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min).

Altura del quemador: 7 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.

En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3, con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente girar el quemador y volver a empezar con la lectura de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad de analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cobre de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Cu/L)} = C_S \times T_S / M_T \times {}_{dEST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de cobre, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T: corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m\,x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

Rango 1	0,04-0,4 mg/L
Rango 2	0,4-3 mg/L

Dependiendo de la absorbancia obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de cobre en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de cobre total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones.

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cobre total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Cu calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluída o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{\ sin\ dig}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL). dsin dig: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el Rango 1 0,04-0,4 mg/L Rango 2 0,4-3 mg/L volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

$d_{\ sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cobre total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Cu calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de cobre en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Cu\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Cu\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Cu\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Cu calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Cu\ M}$: corresponde a la concentración de Cu, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de cadmio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo**: Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son del 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cobre obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3135UY

Determinación de Cromo total en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cromo (Cr) total en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,01- 60 mg/L para aguas naturales y 0,1-60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

El límite de detección es de 0,002 mg/L para aguas naturales y de 0,02 mg/L para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Cálculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz" (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 con autosampler ASC – 7000 (INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total soluble y adherido a partículas, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 357,9 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de cromo se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de cromo.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (según ES 01).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): Ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de cromo: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida FUKA 02733 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: Disolver 1,9230 g de cromo VI (CrO_3 Nro. CAS 1333-82-0, ACS para absorción atómica) en agua 8.2 y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1% v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de cromo: dicha solución se prepara por peso, con balanza 7.8, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de cromo, soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Accutrace QCS-03-1 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de óxido de cromo o utilizar un estándar multielemnetal Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de la curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cromo, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Cromo en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Verificar efecto matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5% del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el contenido soluble de muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de cromo en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de la muestra líquida previo a digerir, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada de 1mL (calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin). Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de cromo

Longitud de onda: 357,9 nm, ancho de rendija 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min

Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).

Conectar el Combustible: acetileno alta pureza

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: Aire –Acetileno (flujo de acetileno 2,8 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 9mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cromo de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Cr/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S corresponde a la concentración de cromo, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST} corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x).

$$y = m x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

Rangos Linealidad Instrumental para Cr	
Rango 1	0,1-0,5 mg/L
Rango 2	0,4-3 mg/L

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de cromo en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2).

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b corresponden a los coeficientes de la curva.

A corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de cromo total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cromo total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M corresponde a la concentración de Cr calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$ corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

TM corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: Solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f/d_f}{(P_M/d_{\ dig})}$$

donde:

P_f corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso contrario, corregir la toma de muestra por la densidad.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Cromo total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M corresponde a la concentración de Cr calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluída o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de cromo en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\ \text{de Recuperación} = 100 \times [(C_{Cr\ M\ AD} \times V_{\ MAD} / d_{\ Dig} - C_{\ Cr\ M} \times (V_{\ MAD} / d_{\ Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{\ Cr\ M\ AD}$ corresponde a la concentración de Cr calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{\ Cr\ M}$ corresponde a la concentración de Cr, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD} corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

$C_{\ EST}$ corresponde a la concentración de cromo del estándar adicionado, en mg/L.

$V_{\ MAD}$ corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

$d_{\ Dig}$ corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son del 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cromo obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3138UY

Determinación de Hierro en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado – R. Huertas

Modificado – V. Muñoz

Revisado – A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado – N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de hierro (Fe) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,3 a 10 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de las muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY)

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz." (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.18. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

2.19. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 248,3 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de hierro se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.

Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de hierro.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio y plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), concentrado al 37 %, d = 1,2 g/mL, Dorwil puro para análisis o similar.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 7.1, preparar anualmente.

8.7. Solución estándar de 1000 mg/L de hierro: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 16596 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de hierro metálico PA (Nro. CAS 7439-89-6) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico 37 % de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1% v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.8. Solución estándar de 100 mg/L de hierro: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.7 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede prepararse utilizando conjuntamente a la solución de hierro, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

8.9. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.7): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 16596 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar tal como se indica en 8.7 a partir de hierro o utilizar un estándar multielemnetal Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente

8.10. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.

8.11. Solución de calcio: disolver 630 mg de carbonato de calcio ($CaCO_3$ Nro. CAS 471-34-1) calidad PA, en 50 mL de ácido clorhídrico 1 + 5, si es necesario, calentar para disolver. Enfriar y diluir a 1000 mL con agua.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.6, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar al menos cuatro soluciones estándar de hierro, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, solución de calcio y agua. La concentración final de ácido deberá ser del 20 % v/v, y 25 % v/v de la solución de calcio. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN13). Calcular la concentración de hierro en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, adicionarle uno de los estándares 8.7, 8.8 u 8.9, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5% del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/ Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de hierro en el filtrado.

Previo a la determinación en el espectrofotómetro, agregar 25 mL de solución de calcio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente (RIN 12). Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de hierro

Longitud de onda: 248,3 nm, Ancho de rendija: 0,2 nm

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2)

Conectar el Combustible: acetileno

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 7,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 9 mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo). De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso con agua, ácido nítrico, solución de calcio tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 25 % v/v en solución de calcio, en tubo de plástico. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de hierro de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Fe/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de hierro, en mg/L, del estándar utilizado (8.7, 8.8 o intermedios preparados a partir de éstos)

T_S: corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T: corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico, más la solución de calcio, más el agua.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.7, 8.8 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de hierro en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de hierro total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Hierro total, mg/L} = (CM \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Fe calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5.) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD1 y FD2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras límpidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{\text{sin dig}}}$$

donde:

M_f: corresponde a las masa final del digesto en g

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{\text{sin dig}}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2:

$$FD_2 = \frac{P_f}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la dilución de la muestra digerida en g (incluyendo solución de calcio).

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad $_{df}$.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 6: Se deberán tener el cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Hierro total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times Mf/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Fe calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco (ver punto 13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de hierro en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{\text{Fe M AD}} \times V_{\text{MAD}} / d_{\text{Dig}} - C_{\text{Fe M}} \times (V_{\text{MAD}} / d_{\text{Dig}} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{\text{Fe M AD}}$: Concentración de Fe calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{\text{Fe M}}$: Concentración de Fe, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: Toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: Concentración de hierro del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig}: Densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los limites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de hierro obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 75 - 125 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3139UY

Determinación de Magnesio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de magnesio (Mg) en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,007 a 1 mg/L, utilizando llama de aire/acetileno u óxido nitroso/acetileno. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 08, RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc), se determina magnesio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 µm. Otro tipo de muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. El metal se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 285,2 nm. El contenido de magnesio se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistentes a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

5.3. La presencia de fosfato interfiere en la determinación por formación de complejos de magnesio, no atomizables en la llama de aire / acetileno. Esta interferencia se elimina por agregado de lantano quien forma un complejo con fosfato de mayor estabilidad, liberando así el magnesio. Dicha interferencia también puede ser eliminada por el uso de la llama de óxido nitroso/acetileno teniendo en cuenta que para este caso se debe agregar una sal de cesio para inhibir la ionización del magnesio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Dejar cámara de aire de 20 mL aproximadamente. Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0° C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0° C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU, AA-7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Quemador de 5 cm para medida con llama de Óxido Nitroso / Acetileno.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

7.9. Lámpara de cátodo hueco de magnesio.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de magnesio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 0,1658 g de óxido de magnesio PA (MgO Nro. CAS 1309-48-4) en ácido nítrico y diluir a 100 mL en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de magnesio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de magnesio, soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert® 42992 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de óxido de magnesio, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2 Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

8.10. Óxido nitroso alta pureza (N_2O Nro. CAS 10024-97-2), 99 %.

8.11. Solución de lantano, disolver 58,65 g de óxido de lantano (La_2O_3 Nro. CAS 1312-81-8 calidad PA) en Erlenmeyer, en 250 mL de ácido clorhídrico 37 % (HCl Nro. CAS 7647-01-0, calidad para análisis de trazas metálicas) hasta disolución total, diluir a 1 L con agua desionizada.

8.12. Solución de cloruro de cesio, disolver 25 g de (CsCl Nro. CAS 7647-17-8 calidad PA) en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de magnesio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de lantano o 10 % v/v la solución de cesio. En caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico. Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 08). Calcular la concentración de calcio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar el efecto de la matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión / Tratamiento de la muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de magnesio en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de la muestra líquida previo a digerir, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1 mL. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de lantano o solución de cesio (según se use llama de aire o de óxido nitroso respectivamente) tal que la concentración final sea de 10 % v/v para el caso de usar la solución de lantano o 10 % v/v en caso de usar la solución de cesio. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de exactitud.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de magnesio.

Longitud de onda: 285,2 nm. Ancho de rendija: 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el Combustible: acetileno.

Conectar el Oxidante: aire u óxido nitroso.

Tipo de llama: de aire (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min) .

Altura del quemador: 7 mm de óxido nitroso (flujo de acetileno 7,0 L/min, flujo de óxido nitroso 11 L/min).

Altura del quemador: 11 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante – atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema, verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de deterioro.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras, medir un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra en tubo de plástico por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, ácido nítrico, lantano o cesio, según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % v/v para cesio o 10 % v/v para lantano y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Determinar las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 3: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de magnesio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Mg/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de magnesio, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma en g del estándar utilizado.

M_T: corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua, más lantano o cesio según corresponda.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m\,x + b$$

12.3. Se determina la concentración de magnesio en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de esta interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2).

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de magnesio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Magnesio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a concentración de Mg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra,

diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blancosiempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2:

$$FD_2 = \frac{P}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio o lantano, según corresponda y agua)

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 4: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Magnesio total, mg/kg} = (C_M \times FD_2) \times M_f/(TM \times d_{dig})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Mg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, (ver punto 13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de magnesio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Mg\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Mg\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Mg\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Mg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Mg\ M}$: corresponde a la concentración de Mg, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de magnesio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 5: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de magnesio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

13.7. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.8. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORA-TION, ANALITYCAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction; 3111 B Direct Air-acetylene flame method y 3111 D Direct Nitrous Oxide – Acetylene Flame Method pp. 201 a 206 y 208 a 209.

14.3. SHIMAZDU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.

3140UY

Determinación de Manganeso en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de manganeso (Mn) en aguas naturales, digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,1 a 8 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8) para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 279,5 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de manganeso se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable.

Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0°C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de manganeso.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio y plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), concentrado al 37 %, d = 1,2 g/mL, Dorwil puro para análisis o similar.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.7. Solución estándar de 1000 mg/L de manganeso: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 77036 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,000 g de manganeso metálico PA (Nro. CAS 7439-96-5) en el mínimo volumen de ácido clorhídrico 37 % de calidad para análisis de trazas metálicas y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.8. Solución estándar de 100 mg/L de manganeso: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.7 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de manganeso, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

8.9. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.7): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 77036 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de manganeso, o utilizar un estándar multielemnetal Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.10. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.

8.11. Solución de calcio: disolver 630 mg de carbonato de calcio ($CaCO_3$ Nro. CAS 471-34-1) calidad PA, en 50 mL de ácido clorhídrico 1 + 5, si es necesario, calentar para disolver. Enfriar y diluir a 1000 mL con agua.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.6, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar al menos cuatro soluciones estándar de manganeso, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, solución de calcio y agua. La concentración final de ácido deberá ser del 20 % v/v, y 25 % v/v de la solución de calcio. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4, lo que descarga una pipeta calibrada por instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN13). Calcular la concentración de manganeso en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, uno de los estándares 8.7, 8.8 u 8.9, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5% del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/ Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de manganeso en el filtrado.

Previo a la determinación en el espectrofotómetro, agregar 25 mL de solución de calcio cada 100 mL de muestra. Registrar el peso de la toma de muestra y el peso final en la ruta de análisis correspondiente (RIN 12). Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidos, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de manganeso

Longitud de onda: 279,5 nm Ancho de rendija: 0,2 nm

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el Combustible: acetileno

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 7mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.

En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante -atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo). De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, ácido nítrico, solución de calcio tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v en ácido si corresponde y 25 % v/v en solución de calcio, en tubo de plástico. Medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de manganeso de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Mn/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de manganeso, en mg/L, del estándar utilizado (8.7, 8.8 o intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T: corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m\,x + b$$

12.3. Se determina la concentración de manganeso en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de manganeso total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Manganeso total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Mn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco siempre que sea necesario (13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida (o diluida en caso de contenido soluble y/o muestras límpidas).

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de calcio).

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a toma de muestra digerida en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2:

$$FD_2 = \frac{P}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

Pf: corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de calcio)

d dig: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

PM: corresponde a toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

Nota 6: Se deberán tener en cuenta todos los factores de dilución realizados a la muestra para el cálculo del contenido total.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Manganeso total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Mn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de manganeso en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Mn\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Mn\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Mn\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Mn calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Mn\ M}$: corresponde a la concentración de Mn, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de manganeso del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d Dig: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 7: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de manganeso obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 75 - 125 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3141UY

Determinación de Mercurio total (orgánico e inorgánico) en matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de vapor frío con sistema de inyección de flujo

Elaborado - R. Huertas

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para la determinación de mercurio total (Hg) en matrices ambientales digeridas (aguas naturales incluyendo salobres o salinas, efluentes industriales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.). El rango de trabajo para aguas naturales, efluentes industriales y la solución resultante del test de lixiviación es de 0,20-250 µg/L, siendo el límite de detección de 0,08 µg/L. Para el caso de sedimentos, residuos sólidos y suelos el rango de trabajo queda definido entre 20 -17500 µg/kg (para una toma de 0,5 g de muestra), siendo el límite de detección de 4 µg/kg. En algunas matrices en particular, estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY)

2.6. Digestión de muestras liquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de mercurio. (3238UY)

2.7. Procedimiento de caracterización de toxicidad de lixiviados en medio ácido acético a pH 5 durante 18 horas. (3261UY)

2.8. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY)

2.9. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 115, INE 96)

2.10. Instructivo de uso de equipo de digestión por microondas ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY Milestone (INE 130)

2.11. Instructivo para el uso del destilador (INE 109) e instructivo de uso de desionizador (INE 82, INE121 y INE 122)

2.12. Rutas de análisis (RIN 06, RIN 07B y RIN 20A)

2.13. Instructivos de uso para el Sistema de Inyección de Flujo para análisis de Mercurio FIMS100 Perkin Elmer (INE 76).

2.14. Instructivo para el procesamiento de datos del programa Win Lab 32 para AA del equipo FIMS-100 (INE 77).

2.15. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La muestra es tratada según el procedimiento correspondiente (2.5, 2.6 o 2.7). El contenido total de mercurio, se determina mediante espectrofotometría de absorción atómica por generación de vapor frio, con un sistema de inyección en flujo. El mercurio mono o divalente presente en la muestra es reducido con cloruro estannoso, en medio ácido a Hg^0. El mercurio elemental producido, es arrastrado por una corriente de gas inerte (Ar) hacia una celda de cuarzo, ubicada en el camino óptico del Espectrofotómetro de Absorción Atómica, donde se determina la absorbancia a una longitud de onda de 253,7 nm. El contenido de mercurio en la muestra se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con lentes de seguridad, guantes resistente a ácidos y túnica.

4.4. Usar siempre la extracción de gases mientras se trabaja con el equipo de absorción atómica, y/o la trampa de carbón activado a la salida de la celda de cuarzo.

4.5. El mercurio y sus compuestos son muy tóxicos: extremar precauciones cuando se trabaja con muestras y soluciones que lo contengan o pudiesen contenerlo.

4.6. Los descartes del equipo (soluciones estándares, muestras, reactivos) son recogido en un recipiente con permanganato reteniendo por oxidación el Hg^0 que pudiera estar presente.

4.7. El bromuro de potasio y el bromato de potasio, son altamente tóxicos. Tener especial precaución a la hora de manipular y disponer soluciones que los contengan. Se recomienda descartarlos en un recipiente separado.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Algunos compuestos orgánicos volátiles pueden absorber en el rango del espectro UV, produciendo errores en la determinación de mercurio. Muestras con alto contenido de cloruros, como aguas de mar o estuarios, y algunos efluentes industriales, pueden liberar cloro gas durante la etapa de digestión. Este, absorbe a la longitud de onda de medida, por lo tanto debe ser eliminado antes de la etapa de reducción con cloruro estannoso ($SnCl_2$).

5.2. La humedad arrastrada junto con el vapor de mercurio hacia la celda de medición, puede condensar sobre la ventana de cuarzo y causar un error en la determinación, para evitarlo, esta debe ser termostatizada (ejemplo con lámpara infrarroja) durante las medidas.

5.3. Ioduro en concentraciones mayores a 0,1 mg/L puede causar interferencias por formación de complejos de mercurio, no reducibles por $SnCl_2$.

5.4. Concentraciones de cobre altas pueden interferir en la determinación. Esta interferencia, en caso de ser posible, se elimina diluyendo los digestos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra líquidas en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 250 mL con contratapa de PTFE. Para el caso de muestras sólidas utilizar una bolsa de muestreo de plástico descartable. La cantidad mínima de muestra requerida para el análisis, es 200 mL para muestras acuosas y 100 g para muestras sólidas.

6.2. Preservar agregando a las muestras acuosas ácido nítrico concentrado hasta pH menor a 2. Indicar la preservación en la etiqueta. Analizar antes de 28 días. Para las muestras sólidas, refrigerar a temperatura ≤ 6 °C (> 0°C) y analizar lo antes posible, previo a los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con celda de cuarzo, generador de vapor frío, y sistema de inyección de flujo (Perkin Elmer FIMS 100).

7.2. Balanza de resolución 0,001 g.

7.3. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 10000 µL).

7.5. Pipeta automática calibrada de volumen fijo de 1 mL.

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 y 50 mL de capacidad.

7.7. Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): Ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente. Trazas de Hg < 5 ppb.

8.4. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado al 37 %, d= 1,16 g/mL, Mallinckrodt UN1789 o equivalente.

8.5. Solución de ácido nítrico al 50 % para lavado: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua desionizada (8.2). Preparar anualmente.

8.6. Solución de cloruro estannoso ($SnCl_2.2H_2O$ Nro. CAS 10025-69-1): pesar 5,5 g de cloruro estannoso para análisis de mercurio, MERCK 596470 o equivalente; agregar 15 mL de ácido clorhídrico concentrado para diluir completamente, y llevar a 500 mL con agua desionizada (8.2). Realizar esta operación en campana de extracción y con precaución, ya que se está agregando agua sobre un ácido fuerte. Preparar previo a la determinación.

8.7. Solución estándar de 1000 mg/L de mercurio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida y trazable a NIST AccuTrace AA34N-1o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta (1 mL de solución corresponde a 1 mg de Hg).

8.8. Solución madre de mercurio (10 mg/L): pesar 0,1 mL de solución madre de 1000 mg/L (8.7), y llevar a 10 mL con agua desionizada (8.2). Registrar la toma y el peso final en gramos el RIN 07B.

8.9. Solución madre de mercurio (0,5 mg/L): pesar 0,5 mL de solución madre de 10 mg/L de mercurio (8.8) y llevar a 10 mL con agua desionizada (8.2). Registrar la toma y el peso final en gramos el RIN 07B.

8.10. Solución madre de mercurio (0,05 mg/L): pesar 1,0 mL de solución madre de 10 mg/L de mercurio (8.9) y llevar a 10 mL con agua desionizada (8.2). Registrar la toma y el peso final en gramos el RIN 07B.

Nota 1: La vigencia de las soluciones madre de mercurio (8.8, 8.9 y 8.10) es de 24 horas.

Nota 2: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

8.11. Material de referencia certificado de mercurio total en la matriz correspondiente, que deberá contener mercurio orgánico e inorgánico.

8.12. Solución de limpieza de HNO_3 al 2 % para limpieza del sistema de toma de muestra.

8.13. Solución carrier: ácido clorhídrico 3 %, preparada a partir de (8.4). Preparar previo a la determinación.

8.14. Solución de hidroxilamina (NH_4OCl Nro. CAS 5470-11-1): disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina, Fluka 101156509 o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por 1 mes.

8.15. Solución de permanganato de potasio ($KMnO_4$ Nro. CAS 7722-64-7): 5 g en permanganato de potasio, Merck 536092 o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Preparar previo a la determinación.

Nota 3: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado convencional, deberá enjuagarse por inmersión en solución (8.5), mínimo 12 horas en la tarrina identificada para tal fin. Luego enjuagar tres veces con agua desionizada (8.2) y finalmente secar en estufa a 100 °C. Este material se mantiene identificado, siendo su único uso para determinación de mercurio. Para los recipientes de digestión, se realiza una corrida de blancos, con ácido nítrico (8.3).

9.2. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio, principalmente con muestras con bajo contenido de Hg, ya que pueden ser objeto de contaminación ambiental, si son manipuladas en ambientes donde previamente se utilizaron reactivos que contienen mercurio. Preferentemente, trabajar con recipientes cerrados de reactivos y muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Los puntos de calibración son preparados dentro de los recipientes de digestión y son tratados de igual manera que las muestras a analizar.

Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de mercurio y un blanco, a partir de las soluciones estándar (8.8 y 8.9) diluyendo con las mismas proporciones de reactivo de digestión correspondiente a la matriz a determinar. Tomar en cuenta para este paso las referencias (2.5 y 2.6).

Registrar el volumen de la toma del estándar y el peso final de la solución en el RIN 07B. Para la preparación de la curva en el caso de matrices líquidas seguir la siguiente tabla:

Solución madre	Volumen sol. madre (mL)	Volumen Final (mL)	Concentración µg/L
8.10	0,05	25	0,1
8.10	0,25	25	0,5
8.9	0,075	25	1,5
8.9	0,25	25	5
8.9	0,6	25	12

Las concentraciones de la curva de calibración deberán tener en cuenta la concentración esperada de las muestras a analizar. Para el caso de matrices sólidas, los agregados de las soluciones de mercurio, se deben calcular teniendo en cuenta el volumen final de muestra, más reactivos de digestión.

10.2. Verificar línea de base con una solución de nítrico al 20 %.

10.3. La sensibilidad del equipo debe ser chequeada antes de realizar las medidas. Para esto se utiliza una solución de 5 µg/L de Hg al 20 % en ácido nítrico. Su absorbancia debe ser de al menos 0,075 unidades de absorbancia en altura.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos (2.5, 2.6 o 2.7), previo a la medida en el espectrofotómetro.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1,0 mL (IN 427 o equivalente). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (RIN 07B).

Medida

11.3. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Sistema de Inyección de Flujo para Análisis de Mercurio FIMS -100 (INE 76).

11.4. Verificar el funcionamiento del equipo, realizando la determinación de un blanco de agua destilada al 20 % en ácido nítrico y una solución estándar de 5 ppb de mercurio, la señal del estándar deberá ser mayor a 0.075 unidades de absorbancia en altura.

11.5. Medir los estándares de la curva de calibración, muestras, duplicados, fortificados y el check de digestión.

11.6. Si la medida de una muestra excede el valor del estándar más concentrado, realizar una dilución por peso de esta muestra, con una solución en las mismas proporciones de reactivos que las utilizadas para la digestión. Todas las soluciones deberán tener la misma densidad. En el caso de ser necesario realizar una fortificación de la dilución, esta deberá hacerse con la solución madre de mercurio (8.8 o 8.9).

11.7. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras, medir un estándar de concentración intermedia y al finalizar todas las medidas, la curva de calibración. Verificar que la absorbancia de los mismos no haya disminuido más del 10 % del valor inicial.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de mercurio de cada solución estándar (8.8, 8.9 y 8.10) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (µg Hg/L)} = (C_S \times T_S) / M_{sol} \ / \ d\,H_2O$$

donde:

C_S corresponde a la concentración de mercurio, en µg/L, del estándar de partida.

T_S corresponde a la toma del estándar utilizado en peso (g), corregido por la densidad.

M_{sol} corresponde a la masa total de la solución (g).

$d\,H_2O$ corresponde a la densidad del agua desionizada (1,0 g/L).

12.2. Calcular la concentración de mercurio en cada punto de la curva de calibración de la siguiente forma:

$$\text{Concentración (µg Hg/L)} = [(C_S \times T_S) / (M_f / d_{dig})]$$

donde:

C_S corresponde a la concentración de mercurio, en µg/L, del estándar utilizado (8.8, 8.9 y 8.10)

T_S corresponde a la toma del estándar utilizado en mL.

M_f corresponde a la masa final del estándar digerido (g)

d_{dig} corresponde a la densidad del estándar digerido (g/mL)

12.3. Se determina la concentración de mercurio en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma, interpolando en la curva de calibración preparada con los estándares, usando un procesador de datos comercial (Excel o equivalente) o con el software del equipo FIMS-100. Al graficar el área de los picos de los estándares (y) en función de la concentración de los mismos (x) se obtiene la siguiente curva:

$$y = mx + b$$

Por lo que:

$$C_M = \frac{(y-b)}{m}$$

donde:

m y b corresponden a los coeficientes de la curva

y corresponde al área de la señal de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración final de mercurio en la muestra de la siguiente forma:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Mercurio µg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M corresponde a la concentración de Hg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda (µg/L).

FD_1, FD_2 corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{Mf / d_{dig}}{T_M / d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$ corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2 (para muestras que superan el mayor punto de la curva):

$$FD_2 = \frac{P_f}{P_M}$$

donde:

P_f corresponde al peso final de la muestra diluida en g, diluyendo con la mezcla de digestión correspondiente.

P_M corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Nota 4: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra necesite ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Mercurio } \mu g/kg = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$ corresponde a la concentración de Hg calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en µg/L.

FD_2 corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto (12.4.3).

ddig corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra (antes o después de la digestión según corresponda):

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times (C_{Hg\ M\ AD} - C_{Hg\ M}) / C_{AD}$$

donde:

$C_{Hg\ M\ AD}$ corresponde a la concentración de Hg de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en µg/L.

$C_{Hg\ M}$ corresponde a la concentración de Hg, de la muestra sin adicionar en µg/L.

C_{AD} corresponde a la concentración del estándar adicionada a la muestra fortificada en µg/L.

Nota 5: Se asume densidad 1 g/mL del estándar utilizado en la fortificación, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia cuya matriz sea similar a las muestras a analizar. El contenido de mercurio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente (8.11).

13.2. **Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según (12.5), debe estar dentro del rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

13.3. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como rangos normalizados o RSD. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un 20 %.

13.4. **Control de blanco:** El control del blanco coincide con el punto de concentración cero de la curva. Esto es debido a que la curva de calibración es digerida junto con la muestra. La señal de blanco no debe superar 0,0150 unidades de absorbencia o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente. En el caso de no cumplir los criterios de aceptación de blancos se evaluará la repetición del análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del FIMS-100, Flow Injection Mercury, Setting Up and Performing Analyses. Perkin Elmer.

14.2. Manual de instrucciones del FIMS-100, Flow Injection Mercury/ Hydride Analyses, Recommended Analytical Conditions and General Information, Perkin Elmer

14.3. Manual de instrucciones del FIMS-100, Flow Injection Mercury, Hardware Guide, Perkin Elmer.

14.4. ISO 12846, Water quality-Determinación of Mercury-Method using atomic absorption spectrometry (AAS) with and without enrichment, First edition 2012-04-15.

14.5. EPA, Method 7470A Mercury in liquid waste, September 1994, revision 1.

14.6. EPA, Method 245.1 Determination of Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, revision 3.0.

3142UY

Determinación de Níquel en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de Níquel (Ni) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,01 a 60 mg/L para aguas naturales y 0,2 a 60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

El límite de detección es de 0,002 mg/L para aguas naturales y de 0,03 mg/L para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 232,0 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de Níquel se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-700, INE105).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de níquel.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): Ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de níquel (Ni Nro. CAS 7440-02-0): usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 42242 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente: disolver 1,000 g de níquel metálico (PA) en el mínimo volumen de ácido nítrico caliente y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de níquel: dicha solución se prepara por peso, en balanza 7.4, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de níquel soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 42242 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de níquel, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de níquel, más un cero por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Níquel en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (el volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherido a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro.

Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de níquel en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidos, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de níquel

Longitud de onda: 232,2 nm, ancho de rendija 0,2 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el Combustible: acetileno de alta pureza

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 1,6 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 7 mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1.

En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3 (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de níquel de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Ni/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de níquel, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T: corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x).

$$y = m\,x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

Rango 1	0,1 – 0,5 mg/L
Rango 2	0,5 – 3 mg/L

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de níquel en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de níquel total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones.

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Níquel total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Ni calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra,

diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f : corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: Solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P}{P_M/d_{\ dig}}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Níquel total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times Mf/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Ni calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra,

diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Mf: corresponde a la masa final del digesto en g.

TM : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de níquel en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\ \text{de Recuperación} = 100 \times [(C_{Ni\ M\ AD} \times V_{\ MAD} / d_{\ Dig} - C_{\ Ni\ M} \times (V_{\ MAD} / d_{\ Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{\ Ni\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Ni calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{\ Ni\ M}$: corresponde a la concentración de Ni, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

$C_{\ EST}$: corresponde a la concentración de níquel del estándar adicionado, en mg/L.

$V_{\ MAD}$: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

$d_{\ Dig}$: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verificar que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son del 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de níquel obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado. Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3145UY

Determinación de Plata en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de plata (Ag) en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 1,00 a 10,0 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY)

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY)

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY)

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY)

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY)

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY)

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32)

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 328,1 nm. Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. El contenido de plata se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Dejar cámara de aire de 20 mL. Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0° C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o esteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0° C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de plata.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución 20 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de plata: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración y densidad conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 39361 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 0,1575 g de nitrato de plata PA ($AgNO_3$ Nro. CAS 7761-88-8) en agua desionizada y diluir a 100 mL en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar protegida de la luz. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de plata: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de plata, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales. Almacenar protegida de la luz.

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 39361 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente preparar uno como se indica en 8.6 a partir de nitrato de plata, o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de plata, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de plata en cada uno de ellos según 12.1. Preparar semanalmente.

10.2. Para verificar efecto de la matriz como se indica en 13.4, en cada tipo de matriz ensayada adicionar, a uno de los duplicados de digestión, adicionarle uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de plata en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en éste último caso solo de ser necesario, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de plata.

Longitud de onda: 328,1 nm Ancho de rendija: 0,7 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min.

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el Combustible: acetileno.

Conectar el Oxidante: aire.

Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,2 L/min, flujo de aire 15 L/min).

Altura del quemador: 7 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico 8.3, (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v si corresponde), en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de plata de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Ag/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración de plata, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S: corresponde a la toma, en g, del estándar utilizado.

M_T: corresponde a la masa total, en g, del estándar utilizado, más el ácido nítrico más el agua.

d_{EST}: corresponde a la densidad de cada solución estándar calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada, en g, y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m\,x + b$$

12.3. Se determina la concentración de plata en la digestión de la muestra (C_M) o en una dilución de la misma interpolando la absorbancias proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada en los estándares (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b: corresponde a los coeficientes de la curva

A: corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar

12.4. Se determina la concentración de plata total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Plata total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Ag calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra,

diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5) previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M : corresponde a la toma de muestra para la digestión en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P}{P_M/d_{dig}}$$

donde:

Pf: corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d dig: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

PM : corresponde a la toma de muestra digerida en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Plata total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$: corresponde a la concentración de Ag calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda, en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f: corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M : corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de plata en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times ((C_{Ag\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Ag\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))) / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Ag\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Ag calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/L.

$C_{Ag\ M}$: corresponde a la concentración de Ag, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD}: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de plata del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{Dig}: corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANÁLITICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de solución estándar 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de plata obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.6, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3146UY

Determinación de Plomo en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de plomo (Pb) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,04 a 60 mg/L para aguas naturales y 0,2 a 60 mg/L para otras matrices ambientales digeridas. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestras debiendo indicar el límite de reporte correspondiente. El límite de detección es de 0,009 mg/L para aguas naturales y de 0,05 para otras matrices ambientales digeridas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 con autosampler ASC – 7000 (INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para contenido total soluble y adherido a partículas, la muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama a 217,0 nm o 283,3 nm. El contenido de plomo se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes resistentes a ácidos.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2, utilizar corrector de fondo. En algunos casos extremos, no usuales en muestras ambientales, elevado contenido de cobre (mayor al 1 %) puede interferir con la línea de 217,0 nm, en este caso usar la línea menos sensible de 283,3 nm.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud (SHIMADZU AA-7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de plomo.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de plomo: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida FLUKA 16595 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 1,5980 g de nitrato de plomo (ACS para Absorción Atómica) en agua 8.2 y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de plomo: dicha solución se prepara por peso con balanza 7.8, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de plomo soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental (tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales).

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Accutrace QCS -03-1 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de nitrato de plomo o utilizar un estándar multielemental Merck Certipur ® 1.09492.0100 o equivalente.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis de muestras sólidas y efluentes, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Para el caso del material utilizado en el análisis de aguas naturales y para el tratamiento de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del Check continuo de verificación de la curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de plomo, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico y agua 8.2 tal que la concentración final de ácido sea del 20 % v/v. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (Registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de Plomo en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Verificar efecto matriz como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 o 8.8, de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz (volumen agregada debe ser menor al 5 % del volumen de muestra). Para el caso de batch de igual matriz analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

Nota 3: En caso de medir el metal soluble, muestras no digeridas, puede obviarse el agregado de ácido nítrico al 20 %, debiendo asegurar que la densidad de la curva de calibración sea la misma que la de las muestras y que la solución utilizada como control de exactitud.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8 previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de plomo en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las líquidas, previo a digerir, en este último caso solo si corresponde, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Registrar en la ruta de análisis correspondiente.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (INE 91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de plomo

Longitud de onda: 217,0 nm, ancho de rendija 1,3 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE 91 punto 14, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min

Tipo de medida: con corrección de fondo (BGC-D2).

Conectar el Combustible: acetileno de alta pureza

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: Aire – Acetileno (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min)

Altura del quemador: 7mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar, junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra por peso en balanza 7.3 con agua 8.2 y ácido nítrico (tal que su concentración final sea aproximadamente 20 % v/v, si corresponde) en tubo de plástico, medir la densidad si corresponde. Alternativamente, girar el quemador y volver a empezar con las lecturas de las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Leer las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 4: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de plomo de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Pb/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S corresponde a la concentración de plomo, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST} corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m\,x + b$$

La relación entre la señal instrumental y la concentración del analito en las soluciones estándares es lineal en dos rangos según la siguiente tabla:

Rangos linealidad Instrumental para Pb	
Rango 1	0,16-0,5 mg/L
Rango 2	0,4-3 mg/L

Dependiendo del área obtenida para las muestras se deberá seleccionar el rango a utilizar.

12.3. Se determina la concentración de plomo en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b corresponden a los coeficientes de la curva.

A corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de plomo total en la muestra, siguiendo las siguientes ecuaciones

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Plomo total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M corresponde a la concentración de Pb calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2 corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$ corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2: Solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f/d_f}{(P_M/d_{dig})}$$

donde:

P_f corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso contrario, corregir la toma de muestra por la densidad.

Nota 5: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Plomo total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$ corresponde a la concentración de Pb calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluída o no según corresponda en mg/L. Para determinar C_M restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de plomo en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Pb\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Pb\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Pb\ M\ AD}$ corresponde a la concentración de Pb calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{Cd\ M}$ corresponde a la concentración de Pb, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD} corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} corresponde a la concentración de plomo del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución 8.6, 8.7 o 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de la solución 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de plomo obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-7000, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL and MEASURING INSTRUMENT DIVISION, 2010, IN404.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction y 3111 B Direct Air-acetylene flame method pp. 201 a 204 y 205 a 206.

3147UY

Determinación de Potasio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se usa para la determinación de potasio (K) en aguas naturales digeridas o no y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en el rango de 0,05 a 2,5 mg/L. El límite de detección es de 0,02 mg/L. Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para aguas naturales (ríos, arroyos, lluvia, subterránea, etc.), se determina potasio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 µm. Otro tipo de muestra es digerida según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8), para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. En ambos casos se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 766,5 nm. El contenido de potasio se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.98.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.

5.3. La interferencia causada por ionización del analito en la llama se minimiza por agregado de un exceso de una solución de cesio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable (dejar cámara de aire de 20 mL). Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0°C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica con llama, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS -7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de potasio.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. 8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1).

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de potasio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 96665 equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o el certificado. Alternativamente: disolver 1,9070 g de cloruro de potasio (KCl Nro. CAS 7447-40-7, PA para Absorción Atómica secado a 110 °C, 1 hora) en agua desionizada (8.2) y diluir a 1 L en matraz aforado, con HNO3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de potasio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5% v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de potasio, soluciones de otros metales de tal forma que quede multielemental. Tener en cuéntala compatibilidad de las sales de los metales.

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 96665 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cloruro de potasio.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

8.10. Solución de cloruro de cesio (CsCl Nro. CAS 7647-17-8), disolver 25 g de CsCl calidad PA en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las, muestras previo, a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales.

Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si alguno de los dos anteriores no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de la calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de potasio, más un cero, por peso utilizando balanza 7.4, en tubos de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L diluyendo con ácido nítrico, agua y solución de cesio tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de cesio (en caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico). Medir la densidad de los estándares pesando lo que descarga una pipeta calibrada por Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin (registrar en la ruta de análisis RIN 08). Calcular la concentración de potasio en cada uno de ellos según 12.1. Vigencia de estos estándares 60 días.

10.2. Para verificar el efecto matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar a uno de los duplicados de digestión uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de muestra. Para el caso de batch de igual matriz, analizar una muestra fortificada cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz analizar según 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si se quiere determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin digestión previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de potasio en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de las muestra líquida previo a digerir, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada por el Instituto Metrológico Nacional o laboratorio acreditado para tal fin. Luego de digerir o filtrar agregar a la muestra solución de cesio tal que la concentración final sea de 10 % v/v. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de la exactitud.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidos, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del espectrofotómetro de absorción atómica (INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de potasio

Longitud de onda: 766,5 nm Ancho de rendija: 0,7mm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 min

Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC).

Conectar el combustible: acetileno

Conectar el oxidante: aire

Tipo de llama: (flujo de acetileno 2,0 L/min, flujo de aire 15 L/min).

Altura del quemador: 7 mm.

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador con el dispositivo adelante –atrás del equipo (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de la calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal como en 10.1, o diluir la muestra en tubo de plástico, por peso en balanza 7.3 con agua 8.2, cesio y ácido nítrico según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % para el cesio y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a comenzar con las soluciones de la curva de calibración.

11.9. Medir las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 3: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz, se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de potasio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg K/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S corresponde a la concentración de plomo, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST} corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m x + b$$

12.3. Se determina la concentración de potasio en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b corresponden a los coeficientes de la curva.

A corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de potasio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Potasio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f / d_{dig}}{T_M / d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$ corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2:

$$FD_2 = \frac{P}{P_M / d_{dig}}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio y agua).

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M : corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

Nota 4: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Potasio total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$ corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluída o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3, solo si corresponde.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

12.5. Se determina la concentración de potasio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{K\,M\,AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{K\,M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{K\,M\,AD}$ corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{K\,M}$ corresponde a la concentración de K, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD} corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} corresponde a la concentración de potasio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 5: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de plomo obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction; 3111 B Direct Air-acetylene flame Method pp. 201 a 206.

14.3. SHIMAZDU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.

14.4. ISO 9964-2 Water quality- Determination of sodium and potassium - part 2: Determination of potassium by atomic absorption spectrometry, 1st edition 1993-05-01.

3149UY

Determinación de Sodio en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas

Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por Llama

Elaborado - R. Huertas

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de sodio (Na) en aguas naturales y otras matrices ambientales digeridas (aguas residuales, residuos sólidos, suelos, sedimentos, soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados, etc.), en los rangos de 0,05 a 1 mg/L y 10 a 50 mg/L según la longitud de onda utilizada (589,0 nm y 330,2 nm respectivamente). Para algunas matrices estos límites pueden verse modificados por características propias de la muestra, debiendo indicar el límite de reporte correspondiente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales." (3262UY).

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY).

2.7. Procedimiento: "Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado" (3260UY).

2.8. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales " (3237UY).

2.9. Procedimiento: "Determinación de la Turbidez en agua. " (1022UY).

2.10. Procedimiento: "Calculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz. " (3276UY).

2.11. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE 94).

2.12. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.13. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.14. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.16. Instructivo de uso de Espectrofotómetro de Absorción Atómica SIMADZU AA-7000 (IN 104) con autosampler ASC – 7000 (IN 105, INE 91).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

2.18. Registro de Patrones Calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.19. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 06, RIN 07 A y B, RIN 16 y/o RIN 20 A y 20 B).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para aguas naturales, se determina sodio soluble filtrando la muestra previo a su preservación por filtro membrana de 0,45 µm. Otro tipo de muestras son digeridas según el procedimiento de digestión correspondiente (2.5, 2.6, 2.7 o 2.8) para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal a una forma libre. En ambos casos se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) con llama, a 589,0 ó 330,2 nm. El contenido de sodio se determina mediante una curva de calibración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La interferencia por materia orgánica se reduce por digestión de la muestra según procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8.

5.2. Alto contenido de sustancias inorgánicas u orgánicas remanentes a la digestión pueden interferir con la medida, ver 10.2.

5.3. La interferencia causada por la ionización del analito en la llama se minimiza por agregado de un exceso de una sal de cesio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de 1 L para aguas naturales o 500 mL para efluentes con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Dejar cámara de aire de 20 mL aproximadamente. Para sedimentos, suelos o residuos sólidos colectar 500 g de muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha o bolsa de muestreo descartable.

6.2. Para muestras líquidas preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0°C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa). Para muestras sólidas preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta el análisis. En todos los casos, analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro de absorción atómica, con quemador de 10 cm de longitud. (SHIMADZU AA7000, con autosampler ACS-7000).

7.2. Lámpara de cátodo hueco de sodio.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE06 ó INE07).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)

7.5. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).

7.6. Tubos de plástico con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos de vidrio o plástico compatibles con autosampler.

7.7. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.8. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L de sodio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida Sigma Aldrich TaceCert ® 05201 equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado. Alternativamente: disolver 2,5420 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS7647-14-5, PA para Absorción Atómica secado a 140 °C 1 hora) en agua desionizada y diluir a 1 L en un matraz aforado, con HNO_3 1 % v/v. Almacenar en frasco de plástico. Es estable por 1 año.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L de sodio: dicha solución se prepara por peso, en frasco de polietileno o polipropileno, tomando 5 mL de la solución 8.6 y llevando a 50 mL con agua destilada y HNO_3 cc. La concentración final de ácido debe ser del 5 % v/v. Dicha solución es estable por 6 meses. Puede preparase utilizando conjuntamente a la solución de sodio, soluciones de otros metales, de tal forma que quede multielemental. Tener en cuenta la compatibilidad de las sales de los metales.

8.8. Estándar de chequeo de exactitud (de origen totalmente independiente del 8.6): estándar de concentración y densidad conocida, Sigma Aldrich TaceCert ® 05201 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta o en el certificado correspondiente. Alternativamente preparar como se indica en 8.6 a partir de cloruro de sodio.

8.9. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2) calidad mínima 99,5 %.

8.10. Solución de cloruro de cesio (CsCl Nro. CAS 7647-17-8), disolver 25 g de CsCl calidad PA en 1000 mL de agua desionizada.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas, o un enjuague único con solución 8.5. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras, previo a la digestión, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de instrumentos, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

9.5. Soluciones con partículas o con altas concentraciones de sólidos disueltos, pueden obstruir el capilar, y/o generar residuos en el quemador modificando el aspecto de la llama. Verificar que esto no ocurra mediante la medida del check continuo de verificación de curva según 13.2 o con la medida de la absorbancia de un estándar cada 10 muestras, la misma no debe variar más de 20 %. Si no se cumple, destapar el capilar o limpiar el quemador según corresponda, y repetir todas las medidas realizadas desde la anterior medida del estándar o Check de calibración.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar en tubos de plástico como mínimo cuatro soluciones estándar de sodio y un cero, utilizando la balanza 7.4 a partir de la solución estándar de 1000 mg/L o de 100 mg/L. Diluir con ácido nítrico, agua desionizada y solución de cesio tal que la concentración final de ácido sea la misma que las muestras y 10 % v/v la solución de cesio. En caso de muestras no digeridas puede omitirse el agregado de ácido nítrico. Medir la densidad de los estándares pesando en la balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada (registrar en la ruta de análisis RIN08). Calcular la concentración de sodio en cada solución estándar según 12.1. La vigencia de las soluciones estándar preparadas es de 60 días.

10.2. Verificar el efecto matriz en el análisis como se indica en 13.4, para cada tipo de matriz ensayada, adicionar uno de los estándares 8.6, 8.7 u 8.8, de tal forma que la fortificación de la muestra sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. El volumen agregado debe ser menor al 5 % del volumen de la muestra. Para el caso de batch de matriz similar, analizar un fortificado cada 5 muestras.

10.3. Si existe efecto de matriz, analizar según procedimiento 3276UY.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión/Tratamiento de la Muestra

11.1. Si es necesario determinar el contenido total (soluble y adherida a partículas), las muestras deben ser digeridas o tratadas según los procedimientos 2.5, 2.6, 2.7 o 2.8, previo a la medida en el espectrofotómetro. Muestras líquidas límpidas pueden ser analizadas sin digestión previa, si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU. Si se requiere contenido soluble, analizar la concentración de sodio en el filtrado.

11.2. Medir la densidad de la muestra digerida y de la muestra liquida previo a digerir, pesando con balanza 7.4 lo que descarga una pipeta calibrada de 1mL. Luego de digerir o filtrar la muestra, agregar solución de cesio (8.10) tal que la concentración final sea de 10 % v/v. Registrar en la ruta de análisis correspondiente. Proceder de igual manera para la solución de control de exactitud.

11.3. En caso de efluentes industriales líquidos o asimilables y matrices sólidas, se deberá realizar todos por duplicado. En caso de aguas naturales, es suficiente con realizar 1 duplicado cada 5 muestras, mínimo uno por batch de muestras.

Medida

11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Espectrofotómetro de absorción atómica (Instructivo INE91).

11.5. Seleccionar las siguientes condiciones de operación:

Lámpara de cátodo hueco de sodio

Longitud de onda: 589,0 nm ó 330,2 según la sensibilidad requerida. Ancho de rendija: 0,2 nm.

Intensidad de lámpara: la indicada por el fabricante o la requerida según instructivo INE91, tiempo mínimo de estabilización de la lámpara 10 minutos

Tipo de medida: sin corrección de fondo (NON-BGC)

Conectar el Combustible: acetileno

Conectar el Oxidante: aire

Tipo de llama: oxidante aire (flujo de acetileno 1,8 L/min, flujo de aire 15 L/min).

Altura del quemador: 7 mm

Medida: mínimo dos determinaciones de 5 segundos cada una, tiempo de prespray 15 segundos.

11.6. Medir los estándares de la curva de calibración, verificar que se cumpla el punto 13.1. En caso de que no se cumpla ajustar la posición del quemador (punto 8.3.1 del manual del equipo). Verificar la limpieza del quemador y del nebulizador (puntos 8.2.1 y 8.2.2.3 del manual del equipo).

De persistir el problema verificar los flujos de los gases y la altura del quemador (punto 4.8 del manual del equipo) y verificar el estado de la lámpara utilizada. De mantenerse el problema, revisar los últimos datos de sensibilidad registrados, para poder evaluar junto con el soporte técnico otro tipo de problema.

11.7. Medir las muestras con sus duplicados y blancos. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras leer un estándar de la curva de calibración o la solución control de verificación continua de calibración.

11.8. Si la medida de la muestra excede el mayor valor de curva preparada, preparar estándares de mayor concentración dentro del rango lineal, como en 10.1 o diluir la muestra por peso en la balanza 7.3 en tubo de plástico, con agua 8.2, solución de cesio y ácido nítrico según corresponda. La concentración final deberá ser aproximadamente 10 % para el cesio y misma proporción de ácido nítrico que las muestras. Medir la densidad. Alternativamente, girar el quemador y volver a medir las soluciones estándares de la curva de calibración.

11.9. Determinar las muestras de control de calidad analítico (control de exactitud y muestras adicionadas).

11.10. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente al menos 3 puntos de la curva de calibración.

Nota 3: Tener en cuenta que siempre es preferible diluir a girar el quemador, ya que al diluir la matriz se diluye también su interferencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de sodio de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg Na/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S corresponde a la concentración de plomo, en mg/L, del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos).

T_S corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T corresponde a la masa total del estándar utilizado más el ácido nítrico más el agua en g.

d_{EST} corresponde a la densidad de cada solución estándar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

d_S corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.6, 8.7 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

12.2. Construir una curva de calibración graficando la señal de absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1, para cada uno de los estándares (x)

$$y = m\,x + b$$

12.3. Se determina la concentración de sodio en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro para la muestra en la curva de calibración preparada con los estándares. (12.2)

$$C_M = \frac{(A - b)}{m}$$

donde:

m y b corresponden a los coeficientes de la curva.

A corresponde a la absorbancia de la muestra a determinar.

12.4. Se determina la concentración de potasio total en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

12.4.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Sodio total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de K calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L. Para determinar la concentración de la muestra restar a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco, siempre que sea necesario (13.5), previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución de la muestra digerida.

12.4.2. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_f/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$ corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), muestras acuosas se asume d = 1 g/mL.

T_M corresponde a la toma de muestra para la digestión, en g.

12.4.3. Cálculo de FD_2:

$$FD_2 = \frac{P_f}{(P_M/d_{\ dig})}$$

donde:

P_f : corresponde al peso final de la muestra diluida en g (incluyendo solución de cesio y agua).

$d_{\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra digerida, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso contrario, corregir la toma de muestra por la densidad.

Nota 4: Siempre que el valor de absorbancia del blanco sea detectable, y la muestra deba ser diluida, tratar el blanco de la misma forma que la muestra previo a su determinación.

12.4.4. Para muestras sólidas:

$$\text{Sodio total, mg/kg} = (C_{M'} \times FD_2) \times M_f/(T_M \times d_{dig})$$

donde:

$C_{M'}$ corresponde a la concentración de Na calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluída o no según corresponda en mg/L. Para determinar CM restar a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco, ver punto 13.5, previo al cálculo a partir de la curva de calibración.

FD_2 corresponde al factor de dilución de la muestra digerida tal como se calcula en el punto 12.4.3.

d_{dig} corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

M_f corresponde a la masa final del digesto en g.

T_M corresponde a la toma de la muestra para la digestión en g.

12.5. Se determina la concentración de sodio en la muestra digerida (sea sólida o líquida) adicionada interpolando en la curva de calibración. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{Na\ M\ AD} \times V_{MAD} / d_{Dig} - C_{Na\ M} \times (V_{MAD} / d_{Dig} - T_{AD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

$C_{Na\ M\ AD}$ corresponde a la concentración de Na calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra adicionada, diluída o no según corresponda en mg/L.

$C_{Na\ M}$ corresponde a la concentración de Na, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra sin adicionar.

T_{AD} corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST} corresponde a la concentración de sodio del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD} corresponde a la masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g

d_{Dig} corresponde a la densidad de la muestra digerida, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 5: Se asume densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** Se trabaja en condiciones máximas de sensibilidad: con el quemador de 10 cm perfectamente alineado, cámara de nebulización no obstruida y lámparas de cátodo hueco y de corrección de background en óptimo estado. En cada calibración se verifica la sensibilidad con el mínimo valor a reportar usando una solución estándar preparada a partir de 8.6, 8.7 o 8.8. En el caso de usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptara una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.4 a partir de 8.8 de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de plomo obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar dentro del rango 70-130 %. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis.

13.5. **Blancos de digestión:** analizar los blancos en conjunto con las muestras. La señal obtenida deberá ser menor a la señal del límite de detección. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su absorbancia en la curva de calibración no debe diferir en más del 10 % respecto a la concentración real.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de instrucciones del Espectrofotómetro SHIMADZU AA-680, SHIMADZU CORPORATION, ANALITYCAL INSTRUMENT DIVISION, 1991.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3020 A Quality assurance/ quality control y 3020 B Quality control practices pp. 189 a 193; Método 3110 Introduction to determining metals by atomic absortion spectrometry pp. 200 a 201; Métodos 3111 A Metals by flame atomic absorption spectrometry Introduction; 3111 B Direct Air-acetylene flame Method pp. 201 a 206.

14.3. SHIMAZDU CORPORATION, Analysis Guide for Flame Atomic Absorption Spectrophotometry.

14.4. ISO 9964-1 Water quality- Determination of sodium and potassium- part 1: Determination of sodium by atomic absortion spectrometry, 1st edition 1993 - 05-01.

3164UY

Determinación de cromo soluble en su estado de oxidación VI, en las matrices: aguas naturales, aguas residuales y otras matrices ambientales digeridas

Método espectrofotométrico

Elaborado - R. Huertas

Modificado - M. Martínez

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para determinar cromo (Cr) soluble en su estado de oxidación VI, en las siguientes matrices: aguas naturales, aguas residuales y otras matrices ambientales digeridas, a partir de 0,004 mg/L con celda de 5 cm (límite de cuantificación). Es posible determinar mayores concentraciones por dilución de la muestra. El límite de detección es de 0,0008 mg/L. El método también es aplicable a aguas salinas o salobres.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: "Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos" (1017UY).

2.6. Procedimiento: "Calculo de concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz" (3276UY).

2.7. Instructivos de uso de balanzas (INE 06,INE 16 A, INE 16B, INE 115).

2.8. Instructivos de uso de Espectrofotómetro (INE 39, INE 40,INE 135 e INE 146).

2.9. Instructivos de uso de analizador de iones (INE 98).

2.10. Instructivos de uso de bomba de vacío (INE 02).

2.11. Instructivos de uso del destilador para la preparación de agua destilada (INE 109).

2.12. Instructivos de uso del desionizador para la preparación de agua desionizada (INE 121).

2.13. Rutas de análisis (RIN 14, RIN 15 y RIN 17).

2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El Cr VI en medio ácido (pH 2,0 ± 0,5) forma un complejo de color rojo violáceo con difenilcarbazida. La intensidad del complejo formado es determinable en un espectrofotómetro a 540 nm. El contenido de Cr VI en la muestra se determina mediante una curva de calibración. En muestras de aguas naturales y aguas residuales se determina Cr VI soluble luego de ser filtradas por 0,45 µm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes resistentes a ácidos y lentes de seguridad.

4.2. El agregado de ácidos concentrados realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Turbidez remanente a la filtración o muestras coloridas, son un obstáculo que se elimina midiendo la muestra previo al desarrollo de color y descontando su absorbancia de la absorbancia de la muestra luego del desarrollo de color. Otra posibilidad es utilizar la muestra como cero en la celda de referencia.

5.2. Alto contenido de molibdeno (Mo), mercurio (Hg) (en más de 200 mg/L) o Vanadio (V) (en más de 10 veces el contenido de cromo) pueden interferir. Estas concentraciones no son usuales en muestras ambientales, por lo que no serán consideradas en el presente procedimiento.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 500mL de muestra en un frasco de plástico (polietileno o equivalente) lavado por inmersión en una solución de ácido nítrico: ácido clorhídrico: agua (HNO_3 : HCl : H_2O) en proporciones 1:2:9, al menos durante 12 horas, o bolsa de polietileno hermética descartable para muestras líquidas. Dejar una cámara de aire de aproximadamente 20 mL. En el caso de no analizar antes de las 24 horas, proceder a filtrar según 11.1 y ajustar el pH entre 9,3 y 9,7 adicionando 1 mL de solución buffer (8.12) más 600 µL de NaOH 5N cada 100 mL de muestra. Si es necesario, agregar más NaOH 5N para llevar la muestra al rango del pH sugerido. Nunca usar un volumen de preservante mayor al 10 % del volumen de la muestra. Almacenar las muestras a una temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C) y analizarlas dentro de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 160-A (INE 39 e INE 40), espectrofotómetro UV-3100 J.P Selecta (INE99) o espectrofotómetro Macherey Nagel nanocolor UV/VIS II.

7.2. Cubetas de vidrio o cuarzo de 1 cm y 5 cm de camino óptico.

7.3. Analizador de iones (Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

7.4. Electrodo ion selectivo de hidrógeno Ross combinado (Orión 8102BN), con su solución de relleno y buffers de calibración.

7.5. Balanza de resolución de 0,001 g

7.6. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 µL y 1000 µL).

7.7. Tubos de plástico con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad.

7.8. Micropipetas de volumen variable de 10 a 1000 µL.

7.9. Jeringas de plástico descartables y filtros de nylon, acetato de celulosa o fibra de vidrio de 0,45 µm de tamaño de poro adaptable a jeringas. Alternativamente usar un equipo de filtración con filtros del mismo tamaño de poro y tipo de material, de 47 mm de diámetro y bomba de vacío.

7.10. Erlenmeyers de 50 - 125 mL de capacidad.

7.11. Frasco de vidrio color ámbar.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)

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

8.3. Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9): preparar una solución de concentración aproximada 0,2 N a partir de ácido sulfúrico concentrado al 95-98 %, Merck SX1244 o equivalente.

8.4. Solución de dilución: acidificar agua con la solución de ácido sulfúrico (8.3) hasta pH 2,0 ± 0,5.

8.5. Solución estándar de 1000 mg/L de cromo VI: disolver 0,1414 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$, Nro. CAS 7778-50-9 PA) previamente secado en una estufa a 150ºC durante 2 horas y diluir a 50 g en tubo de plástico con agua. Determinar la densidad pesando lo que descarga una pipeta calibrada. Es estable por 1 año.

8.6. Solución intermedia: preparar por peso un estándar intermedio de cromo VI (de aproximadamente 10 mg/L), en tubo de plástico, a partir de la solución estándar de 1000 mg/L (8.5) diluyendo con solución de dilución (8.4). Medir la densidad pesando lo que descarga una pipeta calibrada. Vigencia de éste estándar 60 días.

8.7. Estándar de chequeo de exactitud (de origen independiente a la solución 8.5): estándar de concentración y densidad conocida de origen comercial o preparado como en 8.5 a partir de otro lote de dicromato de potasio. Vigencia de éste estándar 6 meses.

8.8. Ácido fosfórico (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2): ácido fosfórico concentrado, 85% Baker 0260-01 o equivalente.

8.9. Solución de difenilcarbazida: disolver 250 mg de 1,5 difenilcarbazida (PA Sigma D-7766 Nro. CAS 140- 22-7 o equivalente) en 50mL de acetona. Almacenar en un frasco de vidrio color ámbar, descartar cuando su color cambia a amarillo-marrón.

8.10. Solución de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 M: pesar 40 g de NaOH PA y diluir en 1L de agua 8.2.

8.11. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5 M: pesar 200 g de NaOH PA y diluir en 1 L de agua 8.2.

8.12. Buffer: disolver 33 g de sulfato de amonio ($(NH_4)2SO_4$ Nro. CAS 7783-20-2) en 75 mL de H_2O desionizada (8.2), agregar 6,5 mL de hidróxido de amonio y llevar a 100 con agua (8.2).

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por el nombre que aparece subrayado.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en una solución de ácido nítrico: ácido clorhídrico: agua (HNO_3: HCl: H_20) en proporciones 1:2:9, al menos durante 12 horas. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos o material dentro del laboratorio. En la determinación de pH, enjuagar exhaustivamente el electrodo entre muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar de cromo VI y un cero en tubos de plástico, a partir de 8.5 u 8.6 diluyendo con solución de dilución 8.4. El volumen final de cada solución debe ser superior a 10mL. Registrar la toma del estándar utilizado y el volumen final. La vigencia de las soluciones estándar es de 1 día.

10.2. Agregar 0,2mL de solución de difenilcarbazida y homogeneizar. Registrar en el RIN 14. Si se van a utilizar celdas de mayor volumen tomar un volumen mayor manteniendo la relación de difenilcarbazida /muestra. Esperar al menos 10 min para el desarrollo del color previo a la medida.

Para la medida en el espectrofotómetro

10.3. Prender el espectrofotómetro siguiendo las instrucciones de uso en el modo espectro.

10.4. Determinar el pico de máxima absorbancia (aproximadamente 540 nm) para una solución estándar de concentración intermedia, utilizando como cero de absorbancia el agua de dilución (8.4).

10.5. Pasar el equipo al modo de medida y utilizarla longitud de onda determinada en el punto 10.4.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Desarrollo de color (registrar en el RIN 14)

11.1. En muestras de aguas naturales y aguas residuales, se determina Cr VI soluble, por lo que primeramente deben filtrarse las muestras por 0,45 µm. Otras matrices ambientales como residuos sólidos y suelos digeridos ya quedan filtradas en el proceso.

11.2. Calibrar el analizador de iones para determinar pH según el instructivo correspondiente.

11.3. Realizar una toma de la muestra de aproximadamente 50 g en un Erlenmeyer. En el caso de soluciones de muestras digeridas, medir la densidad pesando lo que descarga una pipeta calibrada. Agregar 0,25 mL (unas 5 gotas) de ácido fosfórico, acidificar la muestra con solución de ácido sulfúrico a pH 2,0 ± 0,5. Luego del ajuste de pH volver a pesar la muestra. En el caso de muestras liquidas o soluciones de digestión que requieran dilución, dejar registrado en la ruta correspondiente.

11.4. Proseguir como indica el punto 10.2 para la generación del complejo y 10.5 para la determinación espectrofotométrica. Siempre mantener la proporción de difenilcarbazida y muestra.

11.5. Si la medida de la muestra excede el valor más alto de la curva, realizar nuevamente el desarrollo de color con una menor cantidad de muestra y la solución de dilución.

11.6. Para verificar la existencia de efecto de la matriz (13.2), adicionando uno de los estándares 8.5, 8.6, o 8.7, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida. El estándar utilizado debe ser suficientemente concentrado para no diluir la matriz. Verificar el efecto matriz principalmente en muestras digeridas, efluentes y muestras que desarrollan un color diferente al rojo violáceo. En este caso, se sugiere ver el espectro (como se indica en 10.4) utilizando la muestra en vez de una solución estándar, para identificar si el perfil del espectro indica una interferencia en la longitud de onda de medida. Si existe efecto matriz, preparar una curva de calibración como se indica en 10.1 pero usando la muestra acidificada (según 11.2) en vez de solución de dilución (tener en cuenta el procedimiento 3276UY para la Determinación por adiciones estándares).

11.7. Al finalizar todas las lecturas medir nuevamente una solución estándar.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cromo de cada solución estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración C (mg Cr VI/L)} = C_S \times T_S / M_T \times d_{EST} / d_S$$

donde:

C_S: es la concentración de cromo VI en mg/L, del estándar utilizado.

T_S: es la toma en g del estándar utilizado.

M_T: es la masa total, en g, del estándar utilizado, más la solución de dilución más la solución de difenilcarbazida.

d_{EST}: es la densidad de cada solución estándar de la curva.

d_S: es la densidad del estándar utilizado para la preparación de la curva de calibración.

12.2. Si la absorbancia de la muestra no diluida, es menor al menor punto de la escala informar como menor que el límite de cuantificación, si se requiere un límite menor usar celdas de mayor camino óptico y preparar estándares de menor concentración.

12.3. Se determina la concentración de cromo en la muestra y blanco (C_M y C_B) o en una dilución, interpolando en la curva de calibración preparada a partir de las soluciones estándar.

12.4. Graficar Absorbancia en función de la concentración. Los valores obtenidos ajustan a una recta:

$$\text{Abs} = a \times \text{Conc Cr VI (mg/L)} + b$$

donde:

a y b: los coeficientes de la curva.

12.5. Se determina la concentración de cromo VI en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$C_{M,}\ \text{mg/L} = (\text{Abs mtra} - b)/\ a$$

12.5.1. Para muestras líquidas:

$$\text{Cromo VI, mg/L} = C_M \times FD_M$$

donde:

C_M : corresponde a la concentración de Cr VI calculada a partir de la curva de calibración, medida en la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L.

FD_M: corresponde al factor de dilución de la muestra peso/peso, en g/g. Este valor viene de la dilución de la muestra con el reactivo de color.

12.5.2. Para muestras sólidas:

$$\text{Cromo VI, mg/kg} = (\ C_M \times FD_M \times d_{DM'} / d_{DM'Di}) - C_B \times FD_B) \times M_f/(T \times Fh \times d_{DM'})$$

donde:

C_M: corresponde a la concentración de Cr VI calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en mg/L.

FD_M: corresponde al factor de dilución de la muestra digerida peso/peso, en g/g

$d_{DM'}$: corresponde a la densidad de la digestión de la muestra medida en 11.3, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

$d_{DM'Dil}$: corresponde a la densidad de la digestión de la muestra diluida medida en 11.5, calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL)

C_B: corresponde a la concentración de Cr VI en la digestión del blanco en mg/L

FD_B: corresponde al factor de dilución del blanco peso/peso, en g/g

M_f: corresponde a la masa final de la digestión de la muestra, en g.

T: corresponde a la toma de la muestra para la digestión, en g.

Fh: corresponde al factor de corrección por humedad.

Nota 3: se asume densidad del blanco de 1 g/mL. En caso contrario realizar la corrección en el cálculo.

Nota 4: el factor de corrección por humedad se utiliza solo en el caso de que la toma de muestra sea de muestra húmeda.

12.5.3. Calcular el porcentaje de recuperación, en caso de fortificar la muestra según:

$$\%\ \text{de Recuperación Cr VI} = 100 \times ((C_{Cr\ M\ AD} \times V_{MAD} - C_{Cr\ M} \times (V_{MAD} - T_{AD}))) \times d_{EST} / (T_{AD} \times C_{EST} \times d_{DM})$$

donde:

$C_{Cr\ M\ AD}$: corresponde a la concentración de Cr VI, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la muestra adicionada, diluida o no según corresponda en mg/l

$C_{Cr\ M}$: corresponde a la concentración de Cr VI, calculada a partir de la curva de calibración, medida en la muestra sin adicionar

T_{AD}: corresponde a la Toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la concentración de cromo VI del estándar adicionado, en mg/L.

V_{MAD}: corresponde a la masa total de estándar adicionado más muestra, en g

d_{DM}: corresponde para muestras digeridas, densidad de la muestra medida en 11.3

d_{EST}: corresponde a la densidad del estándar adicionado en g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia cuya matriz sea similar a las muestras. Evaluar la exactitud de la determinación utilizando una solución estándar preparado a partir de 8.7. La concentración del mismo debe estar en el rango 75 - 125% del valor declarado. En caso de contar con los gráficos de control correspondientes, los límites quedaran fijados por estos.

13.2. **Adición de estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada, calcular la recuperación de la adición según 12.5, debe estar en el rango 75 - 125%.

13.3. **Control de la precisión:** Se debe de incluir un duplicado cada cinco muestras, mínimo uno por batch de muestras. Se acepta hasta un 20 % como rango normalizado. En caso de existir gráficos de control, los límites quedaran fijados por este.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023” 3500-Cr CHROMIUM A.Indtroduction, B. Colorimetric Method pp. 256 a 258.Method 7196A. Environmental Protection Agency. Julio 1992.

3190UY

Determinación de elementos trazas y cationes mayoritarios en aguas naturales por plasma acoplado inductivamente con detector de masas (ICP-MS)

Elaborado - R. Huertas

Modificado - M. Martínez

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable a la determinación de los elementos establecidos en la Tabla 1 (elementos trazas) y en la Tabla 2 (cationes mayoritarios), en aguas naturales digeridas, o no. Para algunas muestras, estos límites pueden verse modificados por características propias de la matriz o tratamiento previo, debiéndose informar el límite de reporte correspondiente.

Tabla 1

Elemento	Rango mg/L
Li	0.0050-2.5
Be	0.0040-2.5
B	0.50-2.5
Al	0.12-2.5
Cr	0.0026-0.50
Mn	0.0019-2.5
Fe	0.033-2.5
Co	0.00055-2.5
Ni	0.010-0.50
Cu	0.0043-0.50
Zn	0.016-0.50
As	0.0023-0.50
Se	0.0037-0.50
Ag	0.00042-0.25
Cd	0.00017-0.50
Sb	0.0036-0.50
Ba	0.0021-2.5
Pb	0.0018-0.50
Hg	0.00014-0.020

Nota 1: Los rangos establecidos en la Tabla 1 corresponden a muestras digeridas y diluidas 1/10. Para muestras donde se analice contenido soluble y/o no sea necesaria la digestión de la misma, los límites inferiores de reporte serán un orden menor. Para el caso del parámetro mercurio el factor de dilución utilizado es 1/4.

Tabla 2

Elemento	Rango mg/L
Ca	0.13-1.0E+03
Mg	0.51-5.0E+02
K	0.14-1.0E+03
Na	0.66-5.0E+02

Nota 2: Los rangos establecidos en la Tabla 2 corresponden a muestras digeridas y diluidas 1/4. Para muestras donde se analice contenido soluble y/o no sea necesaria la digestión de la misma, los límites inferiores de reporte serán un orden menor.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Procedimiento: "Digestión de muestras liquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales." (3237UY)

2.6. Procedimiento: "Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales" (3236UY)

2.7. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07, INE94).

2.8. Instructivo de uso de equipo de digestión ALTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.9. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.10. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.11. Instructivos de uso del ICP-MS (INE 120 o INE154)

2.12. Instructivo de uso de la centrifuga (INE 49)

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01)

2.14. Rutas de análisis (RIN 13 y RIN 43)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Este procedimiento describe la determinación simultánea de los elementos señalados en la Tabla 1 y 2 por el método de plasma acoplado inductivamente con detector de masas (ICP-MS). Las muestras líquidas son introducidas en el equipo mediante un nebulizador. El aerosol resultante es transportado por gas argón a la antorcha de plasma de radio-frecuencia de alta temperatura, donde los elementos target son desolvatados, atomizados e ionizados. Los iones generados son introducidos, por medio de una interfase de vacío, en el espectrómetro de masas. Los iones introducidos se separan por la relación masa/carga y son detectados por el electromultiplicador. La concentración de los elementos en las muestras se determina mediante una curva de calibración apropiada.

3.2. Si se requiere el contenido total de los analitos, las muestras deben ser digeridas usando los métodos de preparación apropiados (2.5, 2.6). Muestras con turbidez menor o igual a 1 NTU pueden ser analizadas para contenido total sin digestión previa. Para el análisis de contenido soluble se requiere filtración de las muestras por filtro con tamaño de poro 0,45 µm previo a la acidificación y la digestión puede o no ser necesaria.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, guantes resistentes a ácidos y túnica.

4.2. Realizar el agregado de ácidos bajo campana de extracción de gases.

4.3. Realizar el lavado de material con ácido con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Las interferencias isobáricas en ICP-MS están causadas por isótopos de elementos diferentes que forman iones atómicos con la misma relación masa a carga (m/z). Estas pueden ser minimizadas por el uso de ecuaciones de interferencia adecuadas. Otra posibilidad es seleccionar otro isotopo del analito a determinar, que no se encuentre interferido.

5.2. Las interferencias de iones doble cargados o las interferencias isobáricas moleculares en ICP-MS están causadas por iones que tienen más de una carga o átomo, respectivamente. Estas son corregidas por ecuaciones de interferencia apropiadas basadas en la constancia de las relaciones isotópicas observadas para las especies interferentes. Para minimizar este tipo de interferencias es indispensable la optimización de la tuning del equipo de manera de reducir la generación de especies doble carga y de óxidos. La celda de reacción/colisión ayuda a la reducción de las interferencias moleculares para algunos de los elementos analizados.

5.3. Las interferencias físicas o no espectroscópicas están asociadas a la nebulización de la muestra, al proceso de transporte, así como a la eficiencia de ionización. El estándar interno puede ser utilizado para corregir las interferencias físicas. La elección correcta del estándar interno a utilizar para cada analito debe ser de forma tal que los dos se vean afectados de igual manera por la matriz.

5.4. Las interferencias de memoria o carry-over pueden ocurrir cuando son analizados secuencialmente muestras y estándares entre los que hay una gran diferencia de concentración. El tiempo de enjuague entre dos muestras debe ser lo suficientemente largo para eliminar las interferencias significativas de memoria.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o vidrio de borosilicato de 250 mL o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable con cierre hermético.

6.2. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. Analizar antes de 6 meses.

6.3. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para contenido soluble, filtrar la muestra previo a la acidificación de la misma, por tamaño de poro de 0,45 µm. Analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente.

7.2. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 ó INE 07).

7.3. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94 o INE 19).

7.4. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10µL y 10 mL).

7.5. Tubos de plástico, con tapa, descartables, de 10 mL y 50 mL de capacidad y tubos plástico compatibles con autosampler.

7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.7. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro de policarbonato o ésteres de celulosa

8. REACTIVOS

8.1. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente. El ácido nítrico a utilizar debe cumplir 13.5 para cada elemento analizado.

8.2. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)

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

8.4. Soluciones estándares: son necesarias soluciones estándares certificados individuales o multi elementales de los siguientes elementos: Litio, Berilio, Boro, Aluminio, Cromo, Manganeso, Hierro, Cobalto, Níquel, Cobre, Cinc, Arsénico, Selenio, Plata, Cadmio, Antimonio, Bario, Plomo, Calcio, Magnesio, Potasio, Sodio, Merck Certipur ® 1.09492.0100, TraceCert® 92091 o similar. Cuando se preparan soluciones multielementales a partir de estándares individuales, tener en cuenta precipitaciones u otras incompatibilidades. Es necesaria la utilización de soluciones de diferente origen para la preparación de la curva y los controles de calidad.

8.5. Solución estándar interno conteniendo: Bi, Ge, In, Lu, Rh, Sc, Tb, de concentración aproximada de 0,5 mg/L o 0.010mg/L en 5 % de HNO_3 según corresponda.

8.6. Solución de tuning/optimización de instrumento, conteniendo Cerio, Cobalto, Litio7, Magnesio, Talio, Ytrio, de concentración 1 µg/L en 2 % HNO_3. Tuning solution for ICP-MS 7500cs, part. Nro. 5185-5959 o Tune solution Specpure, part. Nro. S55602 conteniendo Ba, Bi, Ce, Co, In ,Li, U de concentración 1 µg/L en 2% HNO_3 y 0.5% HCl más ICAP Q/Qnova Calibratio solution Specpure, part. Nro. S55603.

8.7. Argón de alta pureza (Ar Nro. CAS 7440-37-1; 99,99 %).

8.8. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.1 en agua destilada 8.2

8.9. Solución estándar de 1000 mg/L de mercurio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida y trazable a NIST AccuTrace AA34N-1 o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta (1 mL de solución corresponde a 1 mg de Hg).

8.10. Material de referencia certificado de mercurio en matriz liquida. Deberá contener mercurio en sus formas orgánicas e inorgánicas.

8.11. Solución de tetracloruro de oro en ácido clorhídrico 2 mol/L conteniendo 1000 mg/L de oro, Merck 170216 o equivalente.

8.12. Solución de ácido nítrico al 5 % y oro 1 mg/L: solución al 5 % v/v de ácido nítrico 8.1 y 1 mg/L de oro 8.7 en agua desionizada 8.3.

Nota 4: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 5: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio no descartable utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.8, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.3. Evitar la contaminación del material ya preparado con particulado ambiental, manteniéndolo cubierto. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.2. Manejar las muestras previas a la digestión en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener los recipientes de digestión siempre con tapa dentro de la sala de limpia, solo abrirlas durante la medida.

9.3. Mantener especial cuidado para evitar la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.

9.4. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar como mínimo cuatro soluciones estándar multielementales, más un cero, por peso utilizando balanza 7.3 en tubos de plástico, a partir de la solución estándar 8.4 diluyendo con ácido nítrico 8.1 y agua 8.3 tal que la concentración final de ácido sea del 2 % v/v o del 4% para el análisis de los metales Ca, Mg, K, y Na. Medir la densidad de los estándares pesado en balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cada elemento en cada uno de los estándares según 12.1.

10.2. Para el análisis de Mercurio preparar como mínimo cuatro soluciones estándar, más un cero, por peso utilizando balanza 7.3 en tubos de vidrio, a partir de la solución estándar 8.9 diluyendo con solución 8.12. Medir la densidad de los estándares pesando en balanza 7.3 lo que descarga una pipeta calibrada (registrar en la ruta de análisis RIN 13). Calcular la concentración de cada elemento en cada uno de los estándares según 12.1.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

11.1. Preparación de la muestra: Si corresponde digerir la muestra según el procedimiento adecuado. En muestras de aguas naturales con turbidez menor a 1 NTU se determina el contenido total sin necesidad de una digestión previa. En caso de que se requiera determinar el contenido soluble, filtrar la muestra según 6.2. Si la muestra fue digerida según 2.5 o 2.6, realizar la dilución necesaria para que la concentración final de ácido HNO_3 sea aproximadamente 2 % v/v (para el caso de mercurio 5 % v/v). En el caso de muestras filtradas, realizar el agregado necesario de HNO_3 para que la concentración final de este sea aproximadamente 2 % v/v.

Para analizar Ca, Mg, K, y Na, las muestras son digeridas según el procedimiento adecuado. Luego de la digestión realizar la dilución necesaria para que la concentración final de ácido HNO_3 sea aproximadamente del 4 % v/v.

Registrar la toma de muestra, volúmenes finales de digestión, tomas para dilución y densidades (si es necesario medirlas) en el RIN 43. Para las muestras sin digerir y con HNO_3 2 % y HNO_3 4 % (se considera densidad igual a 1 g/mL).

11.2. Analizar 1 duplicado de digestión o dilución cada 5 muestras, mínimo uno por batch.

11.3. Para verificar el efecto de la matriz como se indica en 13.4, adicionar a una muestra del batch, una cantidad conocida del estándar 8.4 u 8.10 (mercurio) de tal forma que la fortificación sea cuantificable y quede dentro de la escala de medida. El estándar usado debe ser lo suficientemente concentrado para no diluir la matriz. Analizar una muestra fortificada cada 5 muestras. Para las muestras que fueron digeridas, hacer adiciones antes de la digestión. Para la determinación del contenido soluble de metales, hacer adiciones luego de la filtración, preferentemente inmediatamente antes del análisis.

Medida

11.4. Condiciones de operación del instrumento para el ICP-MS Agilent 7500cx: seguir los pasos 1 a 4 del INE 120 para iniciar el equipo, encender el plasma y optimizar los parámetros de operación del instrumento según lo establecido en los manuales del mismo. Imprimir el reporte del Tune y anexarlo a los reportes de resultados para el batch. En caso de usar el equipo Thermo Q-tegra seguir los pasos 1y2 del INE 154, el registro de las condiciones de medida que en el software del equipo.

11.5. Para el ICP-MS Agilent 7500cx: Verificar configuración del método de medida según punto 5 del INE 120 incluyendo concentraciones de las soluciones de calibración y de los estándares internos. En este punto también deberá hacerse la asignación de los elementos para la corrección por estándar interno (usar el Virtual Internal Standar - VIS). Para el Thermo Q-tegra seguir los pasos 3,4 y 4 del INE 154 para establecer las configuraciones del método de medida.

11.6. Las masas a determinar para cada elemento y el modo de medición son los indicados en la Tabla 3 para el equipo ICP-MS Agilent 7500cx.

Tabla 3

Metal	Masa a determinar	Modo de medición
Li	7	No gas mode
Be	9	No gas mode
B	11	No gas mode
Al	27	No gas mode
Cr	52	He mode
Mn	55	No gas mode
Fe	56	He mode
Co	59	No gas mode
Ni	60	No gas mode
Cu	63	No gas mode
Zn	66	No gas mode
As	75	No gas mode
Se	78	He mode
Ag	107	No gas mode
Cd	111	No gas mode
Sb	121	No gas mode
Ba	137	No gas mode
Pb	208	No gas mode
Ca	42	No gas mode
Mg	26	No gas mode
K	39	No gas mode
Na	23	No gas mode
Hg	202	No gas mode

En el caso de usar el Thermo Q-tegra se utilizará el modo KED con celda de colisión activada.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Análisis de datos a partir de una planilla de cálculo:

12.1.1. Calcular la concentración de cada elemento en las soluciones estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu g/L) = C_S \times (T_S / d_S) / (M_T / d_{sol})$$

donde:

C_S: corresponde a la concentración del elemento en µg/L, del estándar utilizado 8.4 o diluciones intermedias preparadas a partir de este.

T_S: corresponde a la toma del estándar utilizado en g.

M_T: corresponde a la masa total de solución en g.

d_S: corresponde a la densidad del estándar utilizado (8.4 ó intermedios preparados a partir de éstos) en g/mL.

d_{sol}: corresponde a la densidad final de la solución estándar preparada, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

12.1.2. Construir una curva de calibración graficando la señal corregida por estándar interno proporcionada por el equipo (y) en función de las concentraciones calculadas según 12.1 para cada uno de los estándares (x).

$$y = m\,x + b$$

Se determina la concentración de cada elemento en la digestión de la muestra (C_M), o en una dilución de la misma interpolando la señal corregida por estándar interno proporcionada por el equipo para la muestra (A), en la curva de calibración preparada con los estándares (12.2).

$$C_M = (A - b) / m$$

donde:

m y b: corresponden a los coeficientes de la curva.

A: corresponde a la señal para la muestra a determinar.

Se determina la concentración final de cada elemento en la muestra siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración total, mg/L} = (C_M \times FD_1 \times FD_2)/1000$$

donde:

CM: corresponde a la concentración de calculada a partir de la curva de calibración, medida en la digestión de la muestra, diluida o no según corresponda en µg/L.

FD_1 y FD_2: corresponde a los factores de dilución para la muestra digerida o filtrada.

12.1.3. Cálculo de FD_1:

$$FD_1 = \frac{M_F/d_{dig}}{T_M/d_{sin\ dig}}$$

donde:

M_f: corresponde a la masa final del digesto o solución acidificada en g.

d_{dig}: corresponde a la densidad de la muestra luego de ser digerida o acidificada, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

$d_{sin\ dig}$: corresponde a la densidad de la muestra previo a digerir o acidificar, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL), para muestras acuosas con una concentración de HNO_3 menor igual a 2 %, se asume d = 1 g/mL.

T_M: corresponde a la toma de muestra para la digestión o dilución, en g.

12.1.4. Cálculo de FD_2: solo si fuera necesario diluir la muestra.

$$FD_2 = \frac{P_f / d_f}{P_M/d_M}$$

donde:

P_f: corresponde al peso final de la muestra diluida en g.

d_M: corresponde a la densidad de la muestra, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

P_M: corresponde a la toma de muestra, en g.

Se considera 1 g/mL la densidad de la solución digerida diluida. En caso de no cumplirse, corregir la toma por la densidad df.

12.2. El análisis de datos puede realizarse desde el software del equipo:

12.2.1. Luego de la determinación realizar el ajuste de las curvas de calibración en el ICP-MS usando los estándares en el rango apropiado (ver punto 8.1 del INE 120 v1). El equipo posee técnicas de regresión apropiadas para determinar las curvas de calibración para cada analito, incluyendo algoritmos que permiten la ponderación de diferentes puntos de curva para encontrar un mejor ajuste al modelo (1/conc). Luego de establecidas las calibraciones apropiadas reprocesar el batch según el punto 8.2 del INE 120 v1 e imprimir los reportes.

12.2.2. Se determina la concentración del analito en la muestra sin adicionar y adicionada in-terpolando en la curva de calibración.

12.2.3. Calcular la recuperación de lo adicionado en la muestra ya digerida según:

$$\%\text{ de Recuperación} = 100 \times [(C_{MAD} \times V_{MAD}/d_{MAD} - C_M \times (V_{MAD}/d_{MAD} - T_{AD}/d_{TAD}))] / (T_{AD} \times C_{EST})$$

donde:

C_{MAD}: corresponde a la concentración final calculada en la muestra adicionada, en µg/L. C_M: corresponde a la concentración final calculada en la muestra sin adicionar en µg/L. TAD: corresponde a la toma del estándar adicionado, en g.

C_{EST}: corresponde a la Concentración del estándar adicionado, en µg/L.

d_{TAD}: corresponde a la densidad del estándar adicionado en g/mL.

V_{MAD}: corresponde a la Masa total de la muestra más el estándar adicionado, en g.

d_{MAD}: corresponde a la densidad de la muestra calculada como el cociente entre la masa que descarga la pipeta en g y el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL).

Nota 6: Se puede asumir densidad del estándar utilizado en la fortificación de 1 g/mL, en caso contrario corregir la toma del mismo. Para muestras acuosas con una concentración de HNO_3 menor igual a 2 %, se asume d = 1 g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la sensibilidad del equipo:** En cada calibración se verifica la sensibilidad utilizando una solución estándar preparada a partir de 8.4 u 8.9, de concentración similar al mínimo valor a reportar. Al usar una concentración cercana al límite de detección, se aceptará una recuperación entre 50 y 150 % de la concentración real. En caso de incumplimiento, evaluar la pertinencia de repetir el análisis, en función de las muestras y la normativa específica.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Verificación inicial de la calibración del instrumento: evaluar la calibración del equipo usando un estándar preparado por peso a partir de 8.4 u 8.10, utilizando balanza 7.3, de origen independiente a la curva, y de concentración dentro del rango de calibración. Este será medido inmediatamente después de los estándares de calibración.

La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90 - 110 % del contenido real, para todos los metales excepto mercurio para el cual se aceptará u rango de 85-115 %, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continua de la calibración: verifica que la respuesta del instrumento no ha cambiado desde la calibración inicial usando un estándar preparado por peso a partir de 8.4 u 8.10, utilizando balanza 7.3 de concentración dentro del rango de calibración. Este estándar será determinado cada 10 muestras aproximadamente. Para el caso de batch con una cantidad de determinaciones superior a 40, es necesario intercalar una curva de calibración intermedia.

Los límites para la aceptación son el 80 - 120 % del valor esperado, para todos los metales excepto mercurio para el cual se aceptará u rango de 85-115 %, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de cada elemento determinado debe estar en el rango 70 - 130 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

13.4. **Adición del estándar:** Medir la muestra y la muestra adicionada según 11.3, calcular el % de recuperación de la adición (12.4). Este debe estar dentro del rango 70 -130 %.

13.5. **Blancos de digestión:** Analizar los blancos en conjunto con las muestras. La concentración obtenida deberá ser menor a la del límite de reporte. En caso contrario, se deberá restar el aporte del blanco.

13.6. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión como la desviación estándar relativa (RSD) o rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

13.7. **Chequeo de curva de calibración:** Se requiere como mínimo un R^2= 0,995 para la curva de calibración. La concentración de cada estándar individual calculada interpolando su señal en la curva de calibración no debe diferir en más del 20 % respecto a la concentración real.

En caso de incumplimiento de alguno de los controles de calidad, evaluar la pertinencia de repetir el análisis, en función de las muestras y la normativa específica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Methods 3125 A Metals by inductively coupled plasma-mass spectromoetry; Introduction y 3125 B Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) pp 232 a 241.

14.2. EPA, Method 6020 B Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry, Julio 2014 Revision 2.

3191UY

Determinación de mercurio total en Sedimentos

Método de analizador directo de mercurio

Elaborado - R. Souza, Analista sector instrumental

Modificado -

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de mercurio (Hg) en sedimentos en el rango de 1 a 6000 µg/kg para una toma de 100 mg, mediante determinación con analizador directo de mercurio (DMA-80).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 07, INE 94, INE 93).

2.6. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122).

2.7. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.8. Instructivo para el uso del Analizador Directo de Mercurio DMA-80 (INE 138).

2.9. Instructivo de uso de mufla (INE 27).

2.10. Ruta de análisis RIN 54.

2.11. Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos). (1050 UY).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se determina la cantidad de mercurio total de la muestra, sin la necesidad de tratamiento previo (medida directa). Una toma de muestra de aproximadamente 100 mg, es introducida en una celda de medida, la cual ingresa en una cámara de combustión, donde se realiza una pirolisis a 600 °C. En estas condiciones, se produce la liberación del mercurio como vapor. Mediante un catalizador, el mercurio liberado es reducido a mercurio elemental y concentrado sobre un amalgamador Mediante calentamiento el mercurio es liberado y determinado espectrofotométricamente a una λ= 253.7.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.

4.2. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Debido a que es un método de determinación directa que trabaja a muy altas temperaturas no se observan interferencias causadas por reactivos. Es importante trabajar en un ambiente libre de mercurio, con material previamente muflado, para evitar aportes por contaminación. El equipo realiza un blanco de limpieza luego de analizar una muestra con alto contenido de mercurio. A pesar de esto, si en un batch se van a analizar muestras que se sospecha tienen un alto contenido de mercurio, es recomendable analizarlas por separado de muestras con bajo contenido.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 500 mL con contratapa de PTFE, o en bolsa de muestreo descartable.

6.2. Preservar en heladera a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta su análisis. Tiempo recomendado de análisis 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador Directo de Mercurio tricelda DMA-80 (Millestone S.R.L) (IN 654).
7.2. Compresor de aire (IN 655).
7.3. Purificador de aire, con regulador de flujo (IN 656).
7.4. Botes de nickel para contener muestras.
7.5. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94).
7.6. Balanza de resolución de 0,00001 g (INE 93, INE 07).
7.7. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).
7.8. Espátula de acero inoxidable.
7.9. Filtro de carbón activado.
7.10. Mufla.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado al 37 %, d= 1,16 g/mL, Mallinckrodt UN1789 o equivalente.
8.3. Solución de ácido clorhídrico 2%: solución al 2 % v/v de ácido clorhídrico (8.2) en agua desionizada (8.1).
8.4. Solución estándar de 1000 mg/L de mercurio: usar estándar para absorción atómica o ICP, de concentración conocida y trazable a NIST AccuTrace AA34N-1o equivalente. La fecha de vencimiento figura en la etiqueta (1 mL de solución corresponde a 1 mg de Hg).
8.5. Material de referencia certificado en matriz sedimentos o similar que deberá contener dicho metal en sus formas orgánicas e inorgánicas.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.
Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material utilizado, luego de lavado, deberá ser muflado a una temperatura superior a los 450 °C
9.2. Manejar las muestras, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio.
9.3. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La curva de calibración del equipo se realiza anualmente, de acuerdo a lo establecido en el manual del mismo. Estas soluciones se prepararan a partir de (8.4), utilizando (8.3) para realizar las diluciones. Los registros para la preparación de las distintas diluciones se registran en el RIN 54.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Tratamiento de la muestra

11.1. Realizar la toma de muestra en una balanza de resolución 0.01 mg (INE 07, INE 93), registrar la toma en el RIN 54.
11.2. Todas las muestras serán analizadas por duplicado.

Medida

11.3. Prender el compresor de aire.
11.4. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Analizador Directo de Mercurio DMA 80 (INE 138).
11.5. Seleccionar el método que se vaya a utilizar de acuerdo al instructivo (INE138).
11.6. Determinar la cantidad de mercurio de un bote sin muestra.
11.7. Determinar la cantidad de mercurio de una solución de estándar realizada a partir de (8.4) como verificación inicial de calibración.
11.8. Medir las muestras con sus duplicados. Aproximadamente cada 10 lecturas de muestras, medir un control de verificación continua de calibración.
11.9. Si la medida de la muestra con una toma inferior a 1 mg excede el mayor valor de curva preparada, se deberá recurrir a los métodos 3262UY y 3141UY.
11.10. Determinar la cantidad de mercurio en las muestras control (8.5).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El equipo calcula la cantidad total de mercurio de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = a.x^2 + b.x + c$$

donde:
a,b,c: corresponden a parámetros de la curva de calibración del equipo
Absobancia: unidades de absorbancia medidas en altura (cm)
X: cantidad de mercurio total en ng

12.2. Se determina la concentración de mercurio de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C\ (ug/kg) = x/m_{corr}$$

donde:
x: cantidad de mercurio total en ng
m_{corr}: masa de muestra en gramos, corregida por el porcentaje de humedad.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Blancos:** Se deberá determinar la cantidad de mercurio en un bote de muestra vacío, la absorbancia en altura no deberá ser mayor a 0,004 unidades de altura. En caso de no cumplimiento deberá realizarse la limpieza interna automática del equipo, hasta que se alcance dicho valor.
13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar preparado por peso utilizando balanza 7.7 a partir de 8.4 de concentración dentro del rango de calibración. La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente.

Verificación continúa de la calibración: verifica que la respuesta del Instrumento no ha cambiado de la calibración inicial usando un estándar preparado por peso utilizando balanza (7.7) a partir de (8.4) de concentración dentro del rango de calibración. Los límites para la aceptación de son el 90-110 % del valor esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente. Este control se deberá realizar cada 10 determinaciones.

13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de mercurio obtenido debe estar en el rango 80-120 % del contenido real, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.
13.4. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión mediante rango normalizado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondiente, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Milestone DMA 80 Manual del Usuario, Milestone S.R.L, Revision 0/2009.

14.2. EPA, Method 7473 Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry. February 2007, Revision 0.

3192UY

Determinación de mercurio total en matrices líquidas

Método de análisis por medida directa

Elaborado - R. Souza

Modificado -

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para la determinación de mercurio (Hg) en aguas naturales, en el rango de 0.1-100 µg/L para una toma de 1000 µL. En el caso de efluentes y solución resultante del test de lixiviación, en el rango de 0.3-100 µg/L trabajando con una toma de 100 µL. La determinación analítica se lleva a cabo mediante la utilización de un analizador directo de mercurio (DMA-80).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 07, INE 94, INE 93).
2.6. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122).
2.7. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).
2.8. Instructivo para el uso del Analizador Directo de Mercurio DMA-80 (INE 138).
2.9. Instructivo de uso de la Mufla (INE 27).
2.10. Ruta de análisis RIN 58.
2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizados en el laboratorio ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se determina la cantidad de mercurio total en la muestra sin la necesidad de un tratamiento previo (medida directa). La toma de muestra a ser analizada depende del tipo de matriz, fijando una toma de muestra de 1000 µL para aguas naturales y 100 µL para efluentes y soluciones resultantes del test de lixiviación. Esta es introducida en una celda de medida, la cual ingresa en una cámara de combustión, donde se realiza una pirolisis a 600 °C. En estas condiciones, se produce la liberación del mercurio como vapor. Mediante un catalizador, el mercurio liberado es reducido a mercurio elemental y concentrado sobre un amalgamador. Mediante calentamiento el mercurio es liberado y determinado espectrofotométricamente a una λ= 253.7.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes.
4.2. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistente a ácidos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Debido a que es un método de determinación directa, que trabaja a muy altas temperaturas no se observan interferencias causadas por reactivos. Es importante trabajar en un ambiente libre de mercurio, con material previamente muflado, para evitar aportes por contaminación. El equipo realiza un blanco de limpieza luego de analizar una muestra con alto contenido de mercurio. A pesar de esto, si en el batch se van a analizar muestras que se sospecha tienen un alto contenido de mercurio, es recomendable analizarlas por separado de muestras con bajo contenido.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 100 mL con contratapa de PTFE, o en bolsa de muestreo descartable.
6.2. Preservar agregando a las muestras acuosas ácido nítrico concentrado hasta pH menor a 2, indicar la preservación en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Analizar antes de 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador Directo de Mercurio tricelda DMA-80 (Millestone S.R.L) (IN 654)
7.2. Compresor de aire (IN 655)
7.3. Purificador de aire, con regulador de flujo (IN 656).
7.4. Botes de nickel para contener muestras.
7.5. Botes de cuarzo para contener muestras.
7.6. Balanza de resolución 0,0001 g (INE 94)
7.7. Micropipetas automáticas de volumen variable (entre 10 y 1000 µL).
7.8. Filtro de carbón activado
7.9. Mufla (FQ 146)

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado al 37 %, d= 1,16 g/mL.
8.3. Ácido clorhídrico diluido: solución al 2 % v/v de ácido clorhídrico (8.2) en agua desionizada (8.1).
8.4. Solución estándar de 1000 mg/L de mercurio: siempre que sea posible, utilizar material de referencia certificado de concentración 1000 mg/L, trazable a NIST, AccuTrace AA34N-1 o equivalente.
8.5. Solución control: material de referencia certificado en matriz líquida o similar, que deberá contener mercurio en sus formas orgánicas e inorgánicas.
8.6. Solución madre de mercurio D1 (10 mg/L): pesar 0,1 mL de solución madre de 1000 mg/L (8.4), y llevar a 10 mL con solución (8.3). Registrar la toma y el peso final en gramos el RIN 58.
8.7. Solución de mercurio D2 (0,5 mg/L): pesar 0,5 mL de solución madre de 10 mg/L de mercurio (8.6) y llevar a 10 mL con solución (8.3). Registrar la toma y el peso final en gramos el RIN 58.
8.8. Solución de mercurio D3 (0,05 mg/L): pesar 1,0 mL de solución madre de 10 mg/L de mercurio (8.7) y llevar a 10 mL con solución (8.3). Registrar la toma y el peso final en gramos el RIN 58.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material utilizado, luego de lavado, deberá ser muflado a una temperatura superior a los 450°C.
9.2. Manejar las muestras, en el laboratorio de tratamiento de muestras para metales. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos o material dentro del laboratorio.
9.3. Tener presente los tiempos de vigencia de estándares.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La curva de calibración del equipo se realiza cada dos años, de acuerdo a lo establecido en el manual del mismo. Estas soluciones se prepararan a partir de (8.5), utilizando (8.3) para realizar las diluciones. Los registros para la preparación de las distintas diluciones se incluyen en el RIN 58.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Tratamiento de la muestra

11.1. Realizar una toma de muestra en balanza de resolución 0.001 (IN 20), registrar la toma en el RIN 58.
11.2. Agregar ácido clorhídrico (8.2), de manera de alcanzar una concentración final en la muestra de 2%. Registrar el peso final en el RIN 58.
11.3. Realizar la toma de muestra (11.2) con micropipeta (7.7). Registrar la toma en el RIN 58.
11.4. Para el caso de efluentes y soluciones resultantes del test de lixiviación, se realiza un duplicado por muestra. En el caso de aguas que puedan considerarse similares en sus características generales, se analiza un duplicado cada cinco muestras.

Medida

11.5. Prender el compresor de aire.
11.6. Prender el instrumento siguiendo las instrucciones del uso del Analizador Directo de Mercurio DMA 80 (INE 138).
11.7. Seleccionar el método a utilizar de acuerdo al instructivo (INE138)
11.8. Determinar la cantidad de mercurio de un bote sin muestra.
11.9. Determinar la cantidad de mercurio de la solución (8.8) como verificación inicial de calibración.
11.10. Medir las muestras y los controles de calidad.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El equipo calcula la cantidad total de mercurio de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = a.x^2 + b.x + c$$

donde:
a,b,c: corresponden a parámetros de la curva de calibración del equipo
Absorbancia: unidades de absorbancia medidas en altura (cm)
X: cantidad de mercurio total en ng

12.2. Se determina la concentración de mercurio de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C\ (ug/L) = n/Vol \times F_{dil}$$

donde:
n: cantidad de mercurio total en ng.
Vol: volumen de muestra en mL.
F_{dil}: factor de dilución.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Blancos:** Se deberá determinar la cantidad de mercurio en un bote de muestra vacío, la absorbancia en altura no deberá ser mayor a 0,004 unidades de altura. En caso de no cumplimiento deberá realizarse la limpieza interna automática del equipo, hasta que se alcance dicho valor.
13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), a partir de la solución (8.8). La concentración medida del mismo debe estar en el rango 90-110 % del contenido real, o de existir, el rango de aceptación será fijado a partir del gráfico de control correspondiente. Este control se deberá realizar cada 10 determinaciones.
13.3. **Control de la exactitud del método:** Evaluarla, de ser posible, con un material de referencia certificado o material de referencia interno cuya matriz sea similar a las muestras y posea el analito de interés. El contenido de mercurio obtenido debe estar en el rango 70-130 % del contenido esperado, o de existir, los rangos serán fijados a partir del gráfico de control correspondiente.

De no contar con material de referencia de la matriz en estudio, realizar un fortificado preparado a partir del material de referencia (8.5). Para el caso de la matriz aguas naturales se realiza un fortificado cada cinco muestras y como mínimo un fortificado por batch. Para el caso de efluentes y solución resultante del test de lixiviación, se realiza un fortificado por muestra.

13.4. **Control de la precisión:** Medir los duplicados de las muestras y determinar la precisión mediante rango normalizado. Para el caso de aguas naturales se realiza un duplicado cada cinco muestra y como mínimo un duplicado por batch. Para el caso de muestras de efluente y solución resultante del test de lixiviación se realizan todas las muestras por duplicado.

Los límites de aceptación de los duplicados deben surgir de los gráficos de control correspondiente, según la matriz analizada. En caso de no contar con los gráficos de control correspondientes, se acepta un máximo de 20 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Milestone DMA 80 Manual del Usuario, Milestone S.R.L, Revisión 0/2009.

14.2. EPA, Method 7473 Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry. February 2007, Revision 0.

3193UY

Determinación de cationes alcalinos y alcalino térreos solubles: sodio, potasio, magnesio y calcio en aguas naturales

Método Cromatografía Iónica sin supresión de la conductividad



Elaborado - V. Muñoz

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de cationes alcalinos y alcalinos térreos solubles: sodio, potasio, magnesio y calcio en aguas naturales.

1.2. Los límites de cuantificación son los siguientes: sodio 0,1 mg/L, potasio 0,1 mg/L, magnesio 0,2 mg/L y calcio 0,01 mg/L para muestras que no son preservadas y se analizan inmediatamente. Para muestras que son preservadas con ácido nítrico los límites de cuantificación son: sodio 0,3 mg/L, potasio 0,2 mg/L, magnesio 1 mg/L y calcio 0,5 mg/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso del Shimadzu HIC-20Asuper (INE 104).

2.6. Instructivos de uso de balanzas (INE 07, INE 93, INE 06, INE 94).

2.7. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.8. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.9. Instructivo de baño con ultrasonido (INE 69).

2.10. Rutas de análisis (RIN 62 y RIN 13).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los cationes de interés son separados según su afinidad relativa en una columna de intercambio catiónico. La detección se realiza con un detector de conductividad. La identificación de los cationes de interés se realiza comparando los tiempos de retención en el cromatograma con el de los estándares respectivos inyectados en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área o altura de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de algún ión a determinar y produzca señal en el detector, será una interferencia. Por ejemplo, altas concentraciones de bases orgánicas de bajo peso molecular pueden interferir con la determinación.

5.2. Altas concentraciones de cualquiera de los iones a determinar, puede interferir con la determinación de un ión cuyo tiempo de retención sea cercano y su concentración mucho menor, la dilución de la muestra pude superar la interferencia.

5.3. Altos niveles de acidez de las muestras, pH muy bajos, pueden interferir por sobrecarga de la columna provocando pérdida de forma o resolución de los picos.

5.4. Descenso o aumento de la fuerza iónica del eluyente puede provocar cambios en el orden de elución de los iones.

5.5. El Sodio es un contaminante común desde fuentes tales como manos, detergente, agua o material de vidrio. Deberá usarse en lo posible material de vidrio y guantes.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco preferentemente de plástico (polietileno o equivalente) de 0,5 L de capacidad, con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Realizar el análisis tan pronto como sea posible (48 horas) manteniendo la muestra a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Si el análisis no se realiza inmediatamente filtrar la muestra, por tamaño de poro de 0,45 µm (filtro de policarbonato o ésteres de celulosa) y preservar ajustando con ácido nítrico concentrado 0.2mL cada 100mL de muestra, indicándolo en la etiqueta. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0°C), en este caso la vigencia de los parámetros será de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo iónico líquido, Shimadzu HIC20Asuper compuesto por:

- Bandeja para los reservorios de fase móvil
- Desgasificador de fase móvil en línea (DGU-20 A3R)
- Bomba para la fase móvil (LC-20ADsp)
- Inyector automático SIL-10 Ai con loop de 50 µL.
- Horno para Columna (CTO-20ACsp)
- Detector de conductividad (CDD-10Asp)
- Dispositivo de comunicación (CBM-20 A)
- Columna catiónica Shim-pack IC-C4, diámetro interno 4,6 mm; largo 15 cm ó equivalente, tamaño de partícula 7µm.

7.2. Equipo de ultrasonido.

7.3. Balanza de resolución 0,00001 g.

7.4. Balanza de resolución 0,001 g.

7.5. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.7. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

7.8. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.

7.9. Micropipetas automáticas de volumen variable.

7.10. Tubos descartables de plástico con tapa de 10 mL y 50 mL de capacidad.

7.11. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).

8.2. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.3. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico calidad PA en agua destilada, preparar anualmente.

8.4. Solución de elución ácido oxálico 2.5mM. Disolver 0.315g de ácido oxálico.$2H_2O$ ($C_2H_2O_4.2H_2O$) en 1L de agua 8.1.

8.5. Soluciones stock de estándares, 1000 mg/L: Secar hasta peso constante a 105 °C las sales indicadas en la tabla adjunta. Pesar con resolución de 0,1 mg lo indicado en la siguiente tabla, y diluir por peso con agua 8.1 a 50 mL en tubo de plástico. Preservar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C), hasta 6 meses. Los valores indicados a continuación son como guía para la preparación del estándar, el valor real debe ser registrado en la planilla RIN 13 “Planilla de Datos de Preparación de estándares”. Alternativamente utilizar soluciones estándares comerciales de trazabilidad adecuada.

Cation	Sal	Peso (g)
Sodio	Cloruro de sodio anhidro (NaCl)	0.1270
Potasio	Fosfato monobasico de Potasio anhydro (KH2PO4)	0.1740
Calcio	Cloruro de Calcio dihidrato (CaCl2.2H2O)	0.1834
Magnesio	Slufato de Magnesio heptahidrato (MgSO4.2H2O)	0,1385

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. Todo el material de plástico debe ser en lo posible descartable.

9.2. Todo el material no descartable utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.3, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.1. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.3. Las muestras deben filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro antes de ser analizadas o si van a ser preservadas antes de ser preservadas.

9.4. La fase móvil debe filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.

9.5. El recipiente para la fase móvil debe ser sonicado con agua 8.1 durante 10 min, previo a su llenado con la fase móvil.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar por lo menos 5 soluciones estándares conteniendo mezcla de los cationes que se quieren determinar y un blanco, por dilución de la solución stock de estándares con agua 8.1. Utilizar estándares de manera de abarcar las concentraciones de cationes esperadas para las muestras analizadas (registrar en la Ruta de Análisis XX).

10.2. Identificar en el cromatograma de cada estándar el pico correspondiente a cada catión y realizar la gráfica de área o altura del pico en función de la concentración en mg/L para cada uno.

10.3. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras y al final de la corrida inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

Nota 2: La preparación de los estándares y de la dilución de las muestras debe hacerse en la balanza analítica de resolución 0,01 mg. Se considera la densidad de las soluciones 1 g/mL debiendo corregir en los cálculos correspondientes en caso que no se cumpla.

Nota 3: En caso de que la concentración esperada de los cationes, se encuentren cercanos a los límites de detección/cuantificación, incluir la concentración del límite de cuantificación como una de las 5 soluciones estándares de la curva de calibración y adicionar una solución con la concentración correspondiente al límite de detección para evaluar la señal a la hora de definir el límite de reporte.

Nota 4: El orden de elución de los cationes, es el siguiente: Sodio, Potasio, Magnesio y Calcio. En caso de dudas en la identificación de los picos preparar estándares para cada anión por separado para establecer los tiempos de retención correspondientes.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Operaciones previas

11.1.1. Preparación de la fase móvil:

Preparar la fase móvil como indica 8.4. Filtrar por vacío con filtro de 0,45 µm. Rellenar el reservorio para la fase móvil y el reservorio de enjuague del inyector con agua 8.1.

11.1.2. Encendido del equipo:

Seguir las instrucciones de operación indicadas en el instructivo de uso para el cromatógrafo (INE 104) para encendido y manejo del mismo.

Ajustar a las siguientes condiciones operativas:

T horno de columna = 40 °C

T detector = 43 °C

Ganancia del Detector = 0,01 o 1,0 (0,01 para muestras preservadas y 1,0 para muestras no preservadas)

Polaridad: -

Respuesta: 1.0 sec

Flujo de bombeo de fase móvil = 0.7 mL/min

LC stop time 30:00 min (verificar que todos los picos salgan en ese tiempo)

Volumen de inyección:150µL.

Nota 5: Cuando el equipo alcanza las condiciones de medida indica LC Ready.

11.1.3. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 5000 µV/min y no posea un ruido superior a 50.00 µV. Estos parámetros se chequean desde el software con el test del "Baseline check". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 45 min y depende de la ganancia del detector seleccionada.

11.2. Filtrar las muestras para eliminar partículas por filtro con 0,45 µm de tamaño de poro.

11.3. Crear la secuencia de medición en el equipo (batch table) según el instructivo de uso del equipo INE 104, incluyendo los estándares, las muestras y los controles de calidad.

11.4. Si el área de cada catión de interés está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.1. Si el área de algún ion es mayor a la correspondiente al último punto de la curva de calibración proceder a diluir la muestra con agua 8.1 (registrar las diluciones realizadas en el RIN XX) o alternativamente realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.

11.5. Luego de finalizado el análisis apagar el cromatógrafo según el instructivo INE 104.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración teniendo en cuenta la toma, el volumen final y la concentración de la solución stock de estándares.

12.2. Calcular en caso de ser necesario los factores de dilución correspondientes a las muestras analizadas.

12.3. Calcular la concentración de cada catión en mg/L interpolando en la curva de calibración correspondiente (área o altura en función de la concentración).

$$X, mg/L = \frac{(A - O) \times FD}{P}$$

donde:

X: corresponde a la concentración del catión de interés

A: corresponde a la área o altura del pico del catión de interés en la muestra

P: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

O: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

Nota 6: Estos cálculos pueden ser realizados por el software del equipo una vez que se ingresan las concentraciones de los estándares de calibración y los factores de dilución de las muestras.

12.4. Calcular la recuperación de la adición de las muestras fortificadas según:

$$\% \text{ recuperación de la adición} = \frac{(X_f - X)}{S} \times 100$$

donde:

X_f: corresponde a la cantidad de analito en la muestra fortificada (mg)

X: corresponde a la cantidad de analito en la muestra sin fortificar (mg)

S: corresponde a la cantidad de analito en el volumen de estándar adicionado (mg)

12.5. Si el área o altura del pico cromatográfico para cada catión de interés en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.

12.6. Si el área o altura del pico cromatográfico del anión de interés de la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación del anión (referencia: "Manual de Control de Calidad Analítico", Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 7: Cuando, por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias. Ver 13.4.

Nota 8: Los datos de área o altura de pico y tiempo de retención se obtienen del reporte de la corrida generado en el software del equipo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. El coeficiente de correlación de la curva utilizada deberá ser $R^2 \geq 0,99$ y la regresión de los puntos de calibración en la curva deberá estar dentro del ± 10 % del valor real de concentración del estándar.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar de concentración similar a la mitad del rango de la curva, preparado desde una fuente independiente a la utilizada para la construcción de la curva (registrar en el RIN XX). Podrá utilizarse una solución de control interno o un material de referencia. La recuperación del valor de concentración real deberá estar dentro del ± 15 %, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de recuperación de la matriz fortificada:** Fortificar una de cada veinte muestras o por lo menos una por batch, con un volumen conocido de una solución estándar de manera que el agregado no aumente el volumen más del 5 % de la toma de muestra fortificada y de manera que la concentración final este dentro del rango de calibración del equipo de lo contrario diluir la muestra fortificada para llevarla al rango de calibración. Procesar la muestra fortificada a través de toda la metodología (registrar la adición en RIN XX). La recuperación del analito agregado deberá estar entre 85 - 115 % del valor agregado, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.4. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una de cada veinte muestras, o por lo menos un duplicado por batch. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un Rango Normalizado de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.

13.5. **Control de blancos:** la concentración de los analitos en la solución blanco deberá estar por debajo de la mitad del límite de reporte (siendo el límite de reporte el Límite de Detección/Cuantificación según el caso).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ASTM D6919-17 Standard Test Method for Determination of Dissolved Alkali and Alkaline Earth Cations and Ammonium in Water and Wastewater by Ion Chromatography.

14.2. Manuales del Cromatógrafo iónico líquido, Shimadzu HIC20Asuper (1404 SHIc 05242-51).

3236UY

Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales

Elaborado - R. Huertas

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de toxicidad (TCLP), etc. para la determinación del contenido de metales. Dado que esta metodología no está diseñada para lograr la descomposición total de la muestra, las concentraciones del analito extraído pueden no reflejar el contenido total en la muestra.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Compendio de Metodologías Analíticas de Referencia y Preservación de Parámetros Ambientales (Versión VIII).

2.6. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07).

2.7. Instructivo de uso de equipo de digestión ANTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.8. Instructivo para el uso del destilador (INE 36).

2.9. Instructivo de uso de desionizador (INE 82, INE 121, INE122).

2.10. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.11. Rutas de análisis (RIN 07 B; RIN 43).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal asociado con partículas a una forma libre determinable por Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) o Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP MS), la muestra es sometida a irradiación de microondas, lo que provoca un rápido calentamiento y aumento de presión, dependiendo de la materia orgánica presente.

3.2. El procedimiento implica la digestión de una alícuota representativa de la muestra (25 mL) con 5 mL de ácido nítrico, en un recipiente cerrado de teflón, transparente a las microondas y resistente a alta presión. Una vez fría la muestra se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose los metales de interés en la solución sobrenadante.

3.3. Con este método se logra la digestión de la muestra en menor tiempo que con el método convencional de calentamiento en plancha calefactora y se minimiza la contaminación debida tanto al ambiente del laboratorio como a la contaminación cruzada entre muestras.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. El agregado de ácidos se debe realizar bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.

4.4. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico contando con los sistemas de seguridad necesarios.

4.5. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.

Nota 1: cada equipo de digestión, presenta sus condiciones de seguridad que deberán ser incorporadas a la rutina de trabajo.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Alto contenido de materia orgánica en las muestras, ver (9.3).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de cierre hermético, frasco de vidrio borosilicato o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. La cantidad de muestra a ser recolectada está definida en el Compendio de Metodologías Analíticas de Referencia y Preservación de Parámetros Ambientales (Versión VIII).

6.2. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Se recomienda analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura (ANTON PAAR Multiwave 3000, ETHOS EASY Milestone o similar).

7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón con tapa, contratapa para cierre hermético y cierre que contiene la membrana de ruptura o el sistema de seguridad que corresponda al modelo del equipamiento.

7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.

7.4. Balanza de resolución 0,001 g.

7.5. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.6. Pipeta automática calibrada de 1000 µL.

7.7. Dispensador de ácidos de 5 mL de volumen o pipeta graduada de 5 mL.

7.8. Centrífuga, o embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente.

7.9. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico: ácido nítrico concentrado (HNO_3 cc Nro. CAS 7697-37-2) al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución 20 al % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. En caso del equipo ANTON PAAR Multiwave 3000, cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida y así evitar daños al magnetrón del equipo. Nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.

9.2. Para el equipo ETHOS EASY, en caso de no completar el rotor, dejar las camisas de protección en los lugares vacíos. Distribuir homogéneamente los recipientes y en lo posible utilizar el anillo exterior.

9.3. Para muestras con alto contenido de materia orgánica, o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases, esperar hasta no se observar más desprendimiento de vapores para cerrar los recipientes de digestión.

9.4. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Pesar el recipiente de digestión (bomba) con una precisión de 1 mg (P1). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (2.11).

11.2. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma de aproximadamente 25 mL, registrar el peso total (P2) correspondiente al recipiente más la muestra.

11.3. Agregar, con pipeta graduada o dispensador, 5 mL de ácido nítrico (8.3). Registrar el peso de la bomba luego del agregado del ácido (P3).

11.4. Realizar por lo menos un blanco con 25 mL de agua 8.2 y 5 mL ácido nítrico.

11.5. Luego de colocar los recipientes de digestión dentro del equipo, seguir las instrucciones definidas en el instructivo del digestor de microondas a ser utilizado.

11.6. Correr el programa. Si el programa se corta, no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento.

11.7. Luego de finalizado el programa de digestión, dejar enfriar el sistema antes de abrirlas. Pesar la bomba con la muestra digerida (P4).

11.8. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico donde será almacena hasta su determinación.

11.9. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pesando con una pipeta calibrada, un volumen conocido.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la pérdida de peso en la digestión según:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = 100 \times (P_4 - P_3) / (P_3)$$

12.2. Calcular la toma de muestra según:

$$TM\ (g) = P_2 - P_1$$

12.3. Calcular la masa final de digestión según:

$$MF\ (g) = P_4 - P_1$$

donde:

P_1 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa, en g.

P_2 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra, en g.

P_3 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra más ácido antes de la digestión, en g.

P_4 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra más ácido después de la digestión, en g.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de pérdida de peso:** si la pérdida de peso es mayor al 10 %, realizar nuevamente la digestión con menor toma de muestra.

13.2. **Control de la precisión:** Para aguas naturales, realizar al menos un duplicado cada cinco muestras, mientras que los efluentes se analizan todos por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal a ser determinado.

13.3. **Control de la exactitud:** Siempre que sea posible evaluar la exactitud digiriendo simultáneamente con la muestra, un material de referencia certificado o solución de control de metales preparada por control de calidad. Tener en cuenta que de esta manera se determina la exactitud de la digestión más la determinación (ver procedimiento de determinación del metal correspondiente).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Kingston. H.M., Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.

14.2. USEPA. 2007. Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. SW-846 Method 3015. USEPA. Washington, D.C.

14.3. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater , 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3030 D Digestion for metals y 3030 K Microwave-assisted digestión, pp 194 a 195 y 198 a 200.

14.4. Manual de instrucciones - Anton Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.

14.5. Manual de instrucciones de microondas ETHOS EASY Maxi-44.

3237UY

Digestión de muestras líquidas en sistema abierto para la determinación de contenido total de metales

Elaborado - R. Huertas

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la digestión de efluentes industriales y aguas naturales con turbidez mayor a 1 NTU para la posterior determinación de metales, salvo mercurio. Dado que esta metodología no está diseñada para lograr la descomposición total de la muestra, las concentraciones del analito extraído pueden no reflejar el contenido total en la muestra.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07).

2.6. Instructivo para el uso del destilador (INE 36).

2.7. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.8. Ruta de análisis (RIN 07 A).

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal asociado con partículas a una forma libre determinable por Espectrometría de Absorción Atómica, una alícuota representativa de la muestra (50 mL) se digiere en Erlenmeyer, en plancha calefactora, con 5 mL de ácido nítrico, hasta obtención de una solución límpida. Una vez fría la muestra, se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose los metales de interés en la solución resultante.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica, guantes apropiados.

4.2. El agregado de ácidos y la digestión deben realizarse bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido debe ser realizado con guantes de plástico resistente a ácidos.

4.4. Siempre que fuese necesario el agregado de ácido o agua durante la digestión, esperar que la temperatura descienda y hacer deslizar la solución sobre las paredes del Erlenmeyer para evitar proyecciones.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de polietileno o polipropileno de cierre hermético, frasco de vidrio borosilicato o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. La cantidad de muestra a ser recolectada está definida en el Compendio de Metodologías Analíticas de Referencia y Preservación de Parámetros Ambientales (Versión VIII).

6.2. Preservar ajustando a pH menor a 2 con ácido nítrico, indicándolo en la etiqueta. Analizar antes de 6 meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Plancha calefactora capaz de alcanzar temperaturas mayores a 150ºC, Cole Parmer o similar.

7.2. Erlenmeyers de vidrio de 125 a 250 mL.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (INE 06 o INE 07).

7.4. Dispensador de ácidos de volumen variable o pipeta graduada de 5 mL.

7.5. Centrífuga, o embudos y filtros de papel Whatman #41 o equivalente, libre de cenizas.

7.6. Recipientes de plástico de 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua desionizada 8.2, preparar anualmente.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Mantener la ebullición moderada para evitar pérdidas de muestra por proyecciones de la misma fuera del Erlenmeyer. Se puede emplear vidrios reloj para reducir la perdida de solución por evaporación y evitar contaminación cruzada por proyecciones de las muestras.

9.2. En casos donde los límites requeridos no sean alcanzados por la medida directa en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica, es necesario recurrir a la concentración de las muestras de aguas naturales. El factor de concentración dependerá de cada muestra en particular, siendo posible en la mayoría de las veces, concentrar en un factor de 10.

9.3. Evitar la evaporación completa de la muestra porque puede ocurrir adsorción del analito de interés a las paredes del Erlenmeyer y/o pérdidas de metales volátiles por sobrecalentamiento.

9.4. Evitar contaminación de la muestra durante la manipulación o digestión, teniendo especial cuidado ya que se está trabajando en un sistema abierto.

9.5. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en una solución 8.4, mínimo 12 horas,. Luego se enjuagan tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Digestión de la muestra

11.1. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma en peso de aproximadamente 50 mL con una precisión de 1 mg y agregar con pipeta graduada o dispensador 5 mL HNO_3 conc. Registrar los pesos del Erlenmeyer vacío (P1) y con muestra (P2). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (2.9)

11.2. En cada corrida de digestión, realizar un blanco con 50 mL de agua desionizada y 5 mL de HNO_3 (8.3).

11.3. Colocar los Erlenmeyer en la plancha, calentar hasta obtención de una solución límpida, en caso contrario agregar más ácido nítrico y aumentar la potencia del calentamiento. No se debe permitir en ningún momento que se evapore completamente la solución.

11.4. Dejar enfriar, pesar el Erlenmeyer más la muestra digerida (P3). En el caso que existan residuos que no puedan ser separados por decantación o centrifugado, filtrar la muestra digerida con papel de filtro. Recoger el filtrado en un recipiente de plástico, donde se almacena la muestra digerida para su posterior determinación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el volumen final de digestión según:

$$V_F\ (mL) = (P_3 - P_1) / d$$

donde:

P_1 corresponde al peso del recipiente de digestión, en g.

P_3 corresponde al peso del recipiente de digestión más muestra más ácido luego de la digestión, en g.

d corresponde a la densidad del digesto en g/mL, calculada como el cociente entre la masa que descarga una pipeta calibrada en g y el volumen nominal de la pipeta en mL.

12.2. Calcular la toma de la muestra según:

$$T_M\ (mL) = (P_2 - P_1)$$

donde:

P_1 corresponde al peso del recipiente de digestión, en g.

P_2 corresponde al peso del recipiente de digestión más muestra previo a la digestión, en g.

Nota 3: Se asume densidad de muestras acuosas de 1 g/mL. En caso contrario calcular como el volumen que descarga una pipeta calibrada, en g, sobre el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL). Corregir la toma de muestra.

12.3. Realizar la determinación como lo establece el procedimiento correspondiente según el metal a determinar.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** siempre que sea posible, evaluar la exactitud digiriendo simultáneamente con la muestra un material de referencia o solución de control de metales preparada por control de calidad.

13.2. **Control de la precisión:** si se trata de efluentes industriales, se deben realizar todas las muestras por duplicado, para el caso de aguas naturales, realizar un duplicado cada cinco muestras, mínimo uno por corrida. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal correspondiente.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3030 D Digestion for metals y 3030 E Nitric Acid Digestion, pp 194 - 196.

3238UY

Digestión de muestras líquidas en sistema cerrado para la determinación de contenido total de mercurio

Elaborado - G. Medina

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la digestión de muestras líquidas con turbidez mayor a 1 NTU, efluentes industriales, aguas naturales, soluciones de extracción del test de lixiviación (TCLP), etc., para la determinación del contenido total de mercurio. Dado que esta metodología no está diseñada para lograr la descomposición total de la muestra, las concentraciones del analito extraído pueden no reflejar el contenido total en la muestra.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento "Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas". Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo˝ (3141UY).

2.6. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 115, INE 96).

2.7. Instructivo de uso de equipo de digestión y ANTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY Milestone (INE 130)

2.8. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.9. Instructivo de uso de desionizador (INE 82, INE 121, INE122).

2.10. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.11. Ruta de análisis código (RIN 07B).

2.12. Registro de preparación de Reactivos, Preparación de reactivos Mercurio Total (RPR 19).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y convertir todo el metal asociado con partículas a una forma libre, determinable por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Sistema de Inyección de Flujo, la muestra es sometida a irradiación de microondas durante unos minutos, lo que provoca un rápido calentamiento y aumento de presión, dependiendo de la materia orgánica presente.

3.2. El procedimiento implica la oxidación del mercurio presente en una alícuota representativa de la muestra (20 mL) con una solución de BrO3-/Br-, digestión con 5 mL de ácido nítrico en un recipiente cerrado de Teflón, transparente a las microondas y resistente a alta presión. Una vez fría la muestra se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose el mercurio total en la misma.

3.3. Con este método se logra la digestión en menor tiempo que con el método convencional (calentamiento en plancha calefactora) y se minimiza la contaminación debida tanto al ambiente del laboratorio como a la contaminación cruzada entre muestras.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. El agregado de ácidos se debe realizar bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.

4.4. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico contando con los sistemas de seguridad necesarios.

4.5. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.

4.6. El mercurio y sus compuestos son muy tóxicos, extremar precauciones cuando se trabaja con muestras y soluciones que lo contengan o pudiesen contenerlo.

4.7. El bromuro de potasio y el bromato de potasio, son altamente tóxicos. Tener especial precaución a la hora de manipular y disponer soluciones que los contengan. Se recomienda descartarlos en un recipiente separado.

Nota 1: cada equipo de digestión, presenta sus condiciones de seguridad que deberán ser incorporadas a la rutina de trabajo.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Alto contenido de materia orgánica en las muestras, ver 9.2.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 250 mL con contratapa de PTFE.

6.2. Preservar utilizando ácido nítrico concentrado (8.3) hasta pH menor a 2 e indicarlo en la etiqueta.

6.3. Se recomienda analizar antes de 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura. (ANTON PAAR Multiwave 3000, ETHOS EASY Milestone o similar).

7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón de 100 mL de capacidad con tapa, contratapa para cierre hermético y cierre que contiene la membrana de ruptura o el sistema de seguridad que corresponda.

7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.

7.4. Balanza de resolución 0,001 g.

7.5. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.6. Dispensador de ácidos de 5 mL de volumen o pipeta graduada de 5 mL.

7.7. Pipeta automática de 100 a 1000 µL.

7.8. Pipeta automática calibrada de 1000 µL.

7.9. Centrífuga, o embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente.

7.10. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente)

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

8.3. Ácido nítrico: ácido nítrico concentrado (HNO_3 cc Nro. CAS 7697-37-2) al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado de mercurio 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.5. Material de referencia certificado en matriz liquida. Deberá contener mercurio en sus formas orgánicas e inorgánicas.

8.6. Solución de hidroxilamina: disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina (NH_4OCl Nro. CAS 5470-11-1), Fluka 55459-250G o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por un mes. Registrar la preparación en RPR 19.

8.7. Solución de bromuro de potasio: disolver 5,95 g de bromuro de potasio (KBr Nro. CAS 7758-02-3) Merck 1.04905.0500 o equivalente, en 250 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por un mes. Registrar la preparación en RPR 19.

8.8. Solución de bromato de potasio: disolver 1,39 g de bromato de potasio ($KBrO_3$ Nro. CAS 7758-01-2) Merck 1.04912.0100 o equivalente, en 250 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por un mes. Registrar la preparación en RPR 19.

8.9. Solución de bromuro de potasio/bromato de potasio: mezclar partes iguales de las soluciones (8.7) y (8.8). Esta solución es estable por una semana.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Para muestras con alto contenido de materia orgánica o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases, esperar hasta que no se generen más desprendimiento de gases y luego cerrar los recipientes de digestión.

9.2. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.4, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin. Para los recipientes de digestión, se realiza una corrida de blancos, con ácido nítrico (8.3).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Se deberá tomar como referencia el procedimiento “Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo, 3141UY” (2.5).

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Registrar el peso del recipiente de digestión (bomba) con una precisión de 1 mg en la ruta de análisis correspondiente (P1).

11.2. Homogeneizar la muestra. Realizar una toma de aproximadamente 20 mL, registrar el peso total (P2) correspondiente al recipiente más la muestra.

11.3. Agregar con pipeta graduada o dispensador, 0,4 mL de solución de bromuro de potasio/bromato de potasio (8.9) y 5 mL de ácido nítrico. Registrar el peso de la bomba tapada luego del agregado del ácido (P3).

11.4. Realizar por lo menos un blanco por batch con 20 mL de agua (8.2), 0,4 mL de solución de bromuro de potasio/bromato de potasio y 5 mL ácido nítrico.

11.5. Dentro de la planificación del Batch de digestión se debe incluir también la curva de calibración y los controles de calidad correspondientes.

11.6. Luego de colocar los recipientes de digestión dentro del equipo, seguir las instrucciones definidas en el instructivo del digestor de microondas a ser utilizado.

11.7. Correr el programa. Si el programa se corta, no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento. Dejar enfriar antes de abrir y referirse al manual del equipo.

11.8. Luego de finalizado el programa de digestión, dejar enfriar el sistema antes de abrirlas. Pesar la bomba con la muestra digerida (P4).

11.9. Agregar 0,25 mL de solución de hidroxilamina (8.6) previo a la determinación.

11.10. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro.

11.11. Realizar el cálculo de pérdida de peso como se indica en 12.1.

11.12. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1mL.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la pérdida de peso en la digestión según:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = 100 \times (P_4 - P_3) / (P_3)$$

12.2. Calcular la toma de muestra según:

$$T_M\ (g) = P_2 - P_1$$

12.3. Calcular la masa final de digestión según:

$$M_F\ (g) = P_4 - P_1$$

donde:

P_1 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa, en g.

P_2 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra, en g.

P_3 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa más muestra más los reactivos antes de la digestión, en g.

P_4 corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa luego de la digestión, en g.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Digerir simultáneamente con las muestras, un material de referencia (8.5). Tener en cuenta que de esta forma se determina la exactitud de la digestión más la determinación. Para el análisis de mercurio se deberá tomar como referencia el procedimiento (2.5).

13.2. **Control de la precisión:** Todas las determinaciones deben realizarse por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal correspondiente. Para el caso de batch de muestras de características similares como es el caso de aguas naturales, se puede realizar un duplicado cada 5 muestras.

13.3. **Blanco de digestión:** El control del blanco coincide con el punto de concentración cero de la curva. Esto es debido a que la curva de calibración es digerida junto con la muestra. Realizar un blanco por cada batch. Verificar que el valor del mismo no supere el límite de detección.

13.4. **Control de pérdida de peso:** si la pérdida de peso es mayor al 10 %, realizar nuevamente la digestión con menor toma de muestra.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Kingston. H.M., Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.

14.2. USEPA. 2007. Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. SW-846 Method 3015 A Rev. 1 02/2007. Washington, D.C.

14.3. ISO 12846, Water quality-Determinación of Mercury-Method using atomic absorption spectrometry (AAS) with and wiout enrichment, First edition 2012-04-15.

14.4. Manual de instrucciones Antón Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.

14.5. Manual de instrucciones de microondas ETHOS EASY Maxi-44.

3260UY

Extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado

Elaborado - G. Medina

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la extracción del contenido total de metales en filtros de material particulado. Puede usarse como método de calentamiento, tanto irradiación con microondas como plancha calefactora.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 07).
2.6. Instructivo de uso de equipo de digestión ANTON PAAR (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130)
2.7. Instructivo para preparación de agua destilada (INE 109).
2.8. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82).
2.9. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).
2.10. Ruta de análisis (RIN 16).
2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El material particulado, suspendido en el aire ambiental, es recolectado en filtros de fibra de vidrio o cuarzo, por 24 horas, usando un muestreador de alto volumen. Cada muestra puede ser analizada en forma individual o se puede realizar una muestra compuesta analizando en forma conjunta los filtros recogidos durante un período de tiempo determinado.

3.2. Los metales asociados al material particulado, son solubilizados por una extracción ácida (HNO_3/HCl), quedando los analitos en forma libre, determinable por espectrofotometría de absorción atómica, la extracción es facilitada por un proceso de calentamiento con irradiación de microondas en sistema cerrado, o en sistema abierto en plancha calefactora.

3.3. Una vez realizada la digestión, la muestra se lleva a un volumen adecuado para su determinación, se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación y se determinan los metales de interés en la solución sobrenadante.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, túnica y guantes apropiados.
4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.
4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes de plástico resistente a ácidos.
4.4. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico contando con los sistemas de seguridad necesarios.
4.5. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.

Nota 1: cada equipo de digestión, presenta sus condiciones de seguridad que deberán ser incorporadas a la rutina de trabajo.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los filtros de fibra de vidrio, si bien son apropiados para el control de metales en aire, los blancos de los elementos metálicos son en general, altos y variables. Los blancos de filtros de fibra de cuarzo tienen menor variabilidad que los filtros de fibra de vidrio.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Los filtros son recibidos doblados por la mitad con el material particulado hacia adentro y colocados en sobres o bolsas de protección. Preservar la muestra en su medio protector entre 15 °C y 30 °C hasta su análisis.

6.2. El tiempo máximo para realizar el seis meses.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

Procedimiento de extracción con microondas:

7.1. Digestor microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura. (ANTON PARA, ETHOS EASY o similar).

7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón de 100 mL de capacidad con tapa, contratapa para cierre hermético y demás accesorios correspondiente a cada equipo en particular.

7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.

Procedimiento de extracción con plancha calefactora:

7.4. Plancha calefactora capaz de alcanzar temperaturas mayores a 150 °C, Cole Palmer o similar.

7.5. Erlenmeyers de vidrio de 100 - 125 mL.

General:

7.6. Balanza de resolución 0,001 g

7.7. Dispensador de ácidos de 10 mL de volumen o pipeta graduada de 10 mL.

7.8. Centrífuga, embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente, o jeringas plásticas y filtros tipo Sartorius Minisart RC 15 o similar.

7.9. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico: ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Ácido clorhídrico: ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado al 37 %, d = 1,19 g/mL, Merck 1.00317 o equivalente.

8.5. Solución de digestión: solución al 5,55 % HNO_3 (v/v) / 16,75 % HCl (v/v). Para preparar 1 litro de solución agregar a 500 mL de agua (8.2), 55,5 mL de HNO_3 (8.3) y 167,5 mL de HCl (8.4), llevar a 1 litro. Se puede preparar individualmente en cada recipiente de digestión, manteniendo las proporciones de los constituyentes; 10 mL de solución: 555 µL de HNO_3 (8.3) y 1675 µL de HCl (8.4).

8.6. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.7. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

Procedimiento de extracción con microondas:

Cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida, de forma de evitar daños al magnetrón del equipo. Nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.

Procedimiento de extracción con plancha calefactora:

9.1. Mantener la ebullición moderada para evitar pérdidas de muestra por proyecciones fuera del Erlenmeyer.

9.2. Evitar la evaporación completa de la muestra, pues puede provocar perdida de metales volátiles por sobrecalentamiento. Controlar la digestión y de ser necesario agregar agua desionizada periódicamente para mantener el volumen del digesto.

9.3. Evitar posible contaminación de la muestra durante la manipulación y/o digestión teniendo en cuenta que se trabaja en sistema abierto.

General:

9.4. Los filtros de fibra de cuarzo son muy frágiles y deben ser manejados con extremo cuidado.

9.5. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.7, mínimo 12 horas. Para el caso de los recipientes de digestión por microondas, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.6, mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua 8.2. Este material se mantiene identificado para tal fin.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Para proteger el filtro durante el cortado y evitar contaminaciones cruzadas, colocarlo abierto entre 2 hojas vírgenes de papel tipo A4 o similar, y posicionarlo en la guillotina. Cortar un trozo 2 cm x 20 cm. Repetir el procedimiento en caso de analizar por duplicado. Una vez obtenida la submuestra a analizar, retirar de la guillotina, guardar los sobrantes del filtro de la muestra original, tal como se indica en el punto 6.1, y proceder a la limpieza de la cuchilla de la guillotina. Para ello, pasar papel tissue o algodón por la misma hasta que salgan limpios.

Nota 4: Según bibliografía, el plomo en material particulado ambiental, se distribuye homogéneamente en el papel de filtro. Sin embargo cuando se realiza el muestreo cerca de carreteras se observa variabilidad a lo largo del filtro por lo que es necesario analizar trozos de papel adicionales por cada exposición.

Procedimiento de extracción utilizando digestor de microondas:

11.1. Registrar el peso del recipiente de digestión con su tapa, con una precisión de 1 mg (P1), en la ruta de análisis correspondiente.

11.2. Tarar la balanza y colocar el trozo de papel de filtro en el recipiente de digestión doblándolo dos veces por la mitad, registrar el peso de la muestra (P2). Asegurarse que el filtro quede colocado adecuadamente de forma que al agregar la solución de digestión lo cubra en su totalidad, de ser necesario ayudarse con una pinza plástica.

11.3. Agregar con pipeta graduada o dispensador, 10 mL de la solución de digestión (8.5).

11.4. Realizar un blanco de digestión y evaluar la necesidad de realizar un blanco de filtro.

11.5. Luego de colocar los recipientes de digestión dentro del equipo, seguir las instrucciones definidas en el instructivo del digestor de microondas a ser utilizado.

11.6. Correr el programa. Si el programa se corta, no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento.

11.7. Luego de finalizado el programa de digestión, dejar enfriar el sistema antes de abrir los recipientes de digestión. Agregar 10 mL de agua desionizada, mezclar y dejar reposar por 30 minutos. Pesar el recipiente de digestión con la muestra digerida (P3).

11.8. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico donde será almacena hasta su determinación.

Procedimiento de extracción con plancha calefactora:

11.9. Registrar el peso del recipiente de digestión, Erlenmeyer de 150 mL, con una precisión de 1 mg (P1), en la ruta de análisis correspondiente.

11.10. Tarar la balanza y colocar el trozo de papel de filtro en el recipiente de digestión doblándolo dos veces por la mitad, registrar el peso de la muestra (P2). Asegurarse que el filtro quede colocado adecuadamente de forma que al agregar la solución de digestión lo cubra en su totalidad, de ser necesario ayudarse con una pinza plástico.

11.11. Agregar con pipeta graduada o dispensador, 10 mL de la solución de digestión (8.5).

11.12. Realizar un blanco de digestión y evaluar la necesidad de realizar un blanco de filtro.

11.13. Colocar el Erlenmeyer en la plancha calefactora, ubicada dentro de la campana de extracción, tapar el recipiente con un vidrio reloj y calentar a ebullición durante 30 minutos. No dejar que la solución de digestión se evapore a sequedad.

11.14. Retirar el Erlenmeyer de la plancha y dejar enfriar. Adicionar agua desionizada hasta alcanzar los 20 mL, enjuagando las paredes del recipiente y el vidrio reloj utilizado. Agitar y dejar reposar por 30 minutos. Registrar el peso final del Erlenmeyer (P3).

11.15. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión, la muestra está lista para su determinación, de no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico donde será almacena hasta su determinación.

11.16. Determinar la densidad (d) de la solución sobrenadante, pesando con una pipeta calibrada, un volumen conocido.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el volumen final de digestión según:

$$V_F\ (mL) = (P_3 - P_2 - P_1) / d$$

donde:

P_1: corresponde al peso del recipiente de digestión, en g.

P_2: corresponde al peso de muestra, en g.

P_3: corresponde al peso del recipiente de digestión más muestra más ácido luego de la digestión, en g.

d: corresponde al densidad del digesto en g/mL.

12.2. Realizar la determinación como lo establece el procedimiento correspondiente según el metal a determinar.

12.3. Una vez determinada la concentración del analito en µg/mL, calcular los µg de la muestra multiplicando por el volumen final de digestión. Luego corregir los µg totales según la fracción analizada del filtro, en caso de analizar una fracción de 2 cm x 20 cm, multiplicar por 12, que es el número total de fracciones que componen el filtro. Luego dividir dichos µg totales por el volumen total de aire que atravesó el filtro en m^3. Dicho volumen se calcula multiplicando caudal, m^3/minuto, por el tiempo operante del HighVol en minutos

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Evaluarla digiriendo simultáneamente con la muestra, un material de referencia en caso de poseerlo. Tener en cuenta que de esta forma se determina la exactitud de la digestión más la determinación.

13.2. **Control de la precisión:** Todas las determinaciones deben realizarse por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento del metal correspondiente.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Kingston. H.M., Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.

14.2. USEPA. 1990. Microwave assisted acid digestion of sediment. Sludge, solids and oils. SW-846 Method 3051A. USEPA. Washington, D.C. USEPA. February 2007. Selection, preparation and extraction of filter material. IO –3-1. USEPA. Washington, D.C.

14.3. Manual de instrucciones - Anton Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.

3261UY

Procedimiento de caracterización de toxicidad de lixiviados en medio ácido acético a pH 5 durante 18 horas

Elaborado - A. Mangarelli

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Para establecer si un residuo sólido es peligroso por su toxicidad al ambiente, se deben conocer los constituyentes que lixivian naturalmente del sólido al medio líquido. Esta normativa técnica está diseñada para simular la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia.

Sometiendo el residuo sólido a este procedimiento, se obtiene un lixiviado para la determinación de constituyentes no volátiles.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Rutas de análisis (RIN 20 A y B).

2.6. Instructivo de uso de balanza (INE 06).

2.7. Instructivo de uso medidor de pH (INE 98).

2.8. Instructivo de uso estufas (INE 64).

2.9. Instructivo de baño de agua con ultrasonido (INE 108, INE 134).

2.10. Instructivo de uso de desionizada Millipore Elix Escentials (INE 121).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. En función de las características del residuo a ser tratado, se pueden plantear distintas situaciones. Para residuos que contienen menos de 0,5 % de sólidos, después de ser filtrado a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,6 - 0,8 µm de tamaño de poro, el líquido resultante se define como extracto lixiviado TCLP (Procedimiento de Caracterización de Toxicidad de Lixiviado por sus siglas en inglés).

Para el caso de residuos que contienen más de un 0,5 % de sólidos, la fase líquida se separa de la fase sólida mediante filtración a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,6 - 0,8 µm de tamaño de poro y se almacena para su posterior análisis. La fase sólida obtenida, tanto si proviene de residuos con contenido de sólido mayor a 0,5 % o 100 % sólido, se reduce el tamaño de partícula, se pesa y se mezcla con una cantidad de solución extractante igual a 20 veces el peso de la fase sólida.

El recipiente conteniendo el residuo junto con la solución extractante, se coloca en un sistema rotatorio y se hace girar a 30 ± 2 revoluciones por minuto durante 18 h ± 2 h. La temperatura se debe mantener en 22 °C ± 3 °C. La solución extractante es seleccionada en función de la alcalinidad de la fase sólida del residuo.

La determinación de los constituyentes no volátiles se realiza de acuerdo a los procedimientos correspondientes.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad.

4.2. El agregado de ácidos realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido realizarlo con guantes resistentes a ácidos.

4.4. Manipular con cuidado ya que se estará trabajando con material potencialmente peligroso por su alta carga de contaminantes tóxicos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se debe recolectar un mínimo de 500 g de muestra. Debido a la alta toxicidad potencial de estas muestras tomar especiales medidas de seguridad en la manipulación.

Las muestras y los extractos obtenidos deben ser preparados para el análisis tan pronto como sea posible. Si se requiere preservación de los residuos, esta debe ser mediante refrigeración a ≤ 6 °C (> 0 °C). Los tiempos de preservación se encuentran en la siguiente tabla:

Contaminante	Desde recolección hasta extracción TCLP (días)	Desde extracción TCLP hasta determinación (días)	Tiempo total transcurrido (días)
Metales excepto mercurio	180	180	360
Mercurio y cromo VI	28	28	56

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de agitación: debe ser capaz de mantener una agitación permanente durante el periodo de lixiviación (18 ± 2 horas), tal que el sólido no se estratifique. Se recomienda un equipo que pueda agitar los recipientes de extracción por inversión a 30 ± 2 revoluciones por minuto (véase anexo 3).

7.2. Recipientes de extracción: los recipientes a utilizar deben de disponer de capacidad suficiente para contener la muestra y el reactivo de extracción, un mínimo de 2,1 litros. Pueden ser de vidrio borosilicato o plástico (no para el caso de lixiviados a los cuales se analizará mercurio). Dependiendo del equipo de agitación, si es por inversión se necesitarán frascos herméticos, en caso contrario se pueden utilizar Erlenmeyer de vidrio borosilicato o plástico. Los recipientes luego de lavados, deberán ser enjuagados con la solución (8.3) durante 2 horas y finalmente se deben de enjuagar tres veces con agua desionizada (8.1). Este material se mantiene identificado para tal fin.

7.3. Sistema de filtración: Es recomendable que el proceso de filtración se lleve a cabo en campana de extracción. El equipo de filtración a utilizar debe trabajar con filtros de 47 mm y el vacío requerido para lograr la separación. En el caso de utilizar filtros de fibra de vidrio, estos deben ser libre de cenizas, sin aglutinantes y tener un tamaño efectivo de poro de 0,6 a 0,8 µm o equivalente. La bomba de vacío a utilizar, debe de permitir la regulación de vacío entre 0,07 y 3,5 Kg/ cm^2.

7.4. Medidor de pH con exactitud de ± 0,05 unidades a 25 °C y electrodo de pH.

7.5. Balanza de resolución 0,01 gramos.

7.6. Erlenmeyer de vidrio de 250 mL

7.7. Vidrio reloj.

7.8. Baño de agua a 50 °C ± 2 °C.

7.9. Agitador magnético.

7.10. Tiras de pH (0-14)

7.11. Estufa con control de temperatura para trabajar a 100 °C ± 5 °C

7.12. Filtro de fibra de vidrio de 0.6-0.8 µm

7.13. Filtro de fibra de vidrio de 0.45 µm

Nota 1: todo el material a utilizar que estará en contacto con la muestra y/o extracto, luego de ser lavado deberá enjuagarse por inmersión en una solución de HNO_3 al 50 % v/v. Finalmente se enjuaga tres veces con agua desionizada.

8. REACTIVOS

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

8.2. Ácido clorhídrico (Ácido clorhídrico Nro. CAS 7647-01-0) 1 N: preparar a partir del Ácido clorhídrico concentrado (37 %) PA, por dilución por un factor de 12.

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) 50 % v/v: preparar a partir del HNO_3 concentrado (65 %) PA, por dilución por un factor de 2.

8.4. Hidróxido de sodio 1 N (Hidróxido de sodio Nro. CAS 1310-73-2): tomar 40 g de Hidróxido de sodio PA y diluir a 1 L.

8.5. Hidróxido de sodio 5 N (Hidróxido de sodio Nro. CAS 1310-73-2): tomar 200 g de Hidróxido de sodio PA y diluir a 1 L.

8.6. Ácido acético glacial (CH_3-COOH Nro. CAS 64-19-7) grado reactivo analítico.

8.7. Reactivos de extracción.

8.7.1. Reactivo de extracción 1: añadir 5,7 mL de ácido acético glacial a 500 mL de agua desionizada, añadir 64,3 mL de Hidróxido de sodio 1 N y llevar a un litro. Verificar que el pH de este reactivo se encuentre entre 4,88 y 4,98 unidades de pH.

8.7.2. Reactivo de extracción 2: diluir 5,7 mL de ácido acético glacial con agua desionizada a un volumen de 1 litro. Verificar que el pH de este reactivo se encuentre entre 2,83 y 2,93 unidades de pH.

El pH debe ser verificado antes de usar el reactivo, para asegurar que sea el correcto, en su defecto ajustar con los reactivos de preparación. Si se encuentran impurezas o soluciones coloreadas, se debe desechar el reactivo y preparar nuevamente.

8.8. Buffer amonio: disolver 33 g de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$ Nro. CAS 7783-20-2) en 75 mL de H_2O desionizada, agregar 6,5 mL de hidróxido de amonio y llevar a 100 con agua. Preparar en pequeños volúmenes.

Nota 2: Es posible optimizar la preparación de los reactivos de extracción preparando una dilución intermedia de ácido acético, mezclando luego con los reactivos necesarios y llevando a volumen con agua desionizada. Ver Anexo 2.

Nota 3: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Selección del reactivo de extracción apropiado (véase anexo 2)

Pesar una fracción de la fase sólida, reducir (si es necesario) a un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm de diámetro o menor y transferir 5,0 g a un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Añadir 96,5 mL de agua desionizada, cubrir con un vidrio de reloj y agitar vigorosamente por 5 minutos, utilizando un agitador magnético. Determinar el pH.

Si el pH es menor a 5,0 utilizar el reactivo de extracción 1. Puede utilizarse tiras de pH, a excepción de aquellas muestras que indiquen pH en la zona de definición. Si el pH es mayor a 5,0 añadir 3,5 mL de ácido clorhídrico 1 N, mezclar y cubrir con un vidrio de reloj. Calentar a 50 °C en baño de agua, con agitación y mantenga esta temperatura por 10 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente y determinar el pH. Si éste es menor a 5,0 usar el reactivo de extracción 1. Si es mayor a 5,0 usar el reactivo de extracción 2. Puede utilizarse tiras de pH, a excepción de aquellas muestras que indiquen pH en la zona de definición.

11.2. **Reducción de tamaño de partícula.**

Previo a la toma de muestra, si el material sólido tiene un área menor de 3,1 cm^2/g o tamaño mayor a 1 cm^3, se debe proceder a triturar o moler (tamiz estándar de 9,5 mm).

11.3. **Procedimiento de extracción. (véase anexo 1)**

11.3.1. Si el residuo es 100 % sólido, tomar una muestra de 100 g. Proseguir según punto 11.3.12. Solo se usará una toma menor en caso que el residuo sea de baja densidad y el volumen total de la solución de extracción supere el del recipiente de extracción.

11.3.2. Si el residuo contiene menos de 0,5 % de sólidos, la porción líquida del residuo, después de la filtración por 0,6 – 0,8 µm, se define como el extracto de lixiviación LIXIV A. Por lo tanto, se debe filtrar suficiente muestra para que la cantidad de líquido filtrado alcance para realizar todos los análisis requeridos. Descartar el sólido remanente en el filtrado y proseguir a partir del punto 11.4.3.

11.3.3. Si el residuo contiene más del 0,5 % de sólidos y contiene líquidos libres se requiere una separación sólido-líquido. Determinar el tamaño óptimo de la muestra que se llevará a filtración para obtener un mínimo de 200 g de sólido.

11.3.4. Pesar el filtro y el recipiente que recibirá el filtrado por separado.

11.3.5. Ensamblar al equipo de filtración y colocar el filtro en el soporte y asegúrelo.

11.3.6. La centrifugación se usará solamente como una ayuda de la filtración.

11.3.7. Transferir cuantitativamente la muestra (fase líquida y sólida) al equipo de filtración. Agregar la muestra en forma uniforme sobre la superficie del filtro.

11.3.8. Aplicar gradualmente vacío o presión de 0,07 – 0,70 kg/ cm^2, hasta que el aire de presurización pase a través del filtro. Si este punto no se alcanza a 0,70 kg/cm^2, y si no pasa líquido adicional por el filtro, en un intervalo de 2 minutos, lentamente incrementar la presión en intervalos de 0,7 kg/ cm^2, hasta un máximo de 3,5 kg/ cm^2. Cuando el gas de presurización comienza a pasar por el filtro, o cuando cesa el flujo de líquido a 3,5 kg/cm^2 y si en el período de 2 minutos no hay un filtrado adicional, se detiene la filtración. Algunos residuos, como los aceitosos o residuos de pintura, contienen material que tiene la apariencia de líquido, pero si después de aplicar vacío o presión el residuo no pasa a través del filtro, se clasifica como 100 % sólido. En el proceso de filtrado, no se debe reemplazar el filtro original con uno nuevo.

11.3.9. El material retenido en el filtro se define como la fase sólida del residuo y el filtrado como la fase líquida.

11.3.10. Determine el peso de la fase líquida y sólida, restando el peso del recipiente vacío, del peso total del recipiente con el filtrado. Determine el peso de la porción sólida de la muestra restando el peso de la fase líquida del peso total de la muestra. La fase líquida puede ser analizada o preservada a ≤ 6 °C (> 0 °C)

11.3.11. Preparar la porción sólida del residuo para extracción (punto 11.2). Cuando el tamaño de partícula esté preparado adecuadamente, transfiera cuantitativamente 100 g del sólido a un recipiente de extracción. En el caso de haber realizado separación sólido-líquido incluya en el recipiente de extracción el filtro usado.

11.3.12. Determine la cantidad del reactivo de extracción necesario como sigue:

Para residuos 100 % sólido:

Peso del reactivo de extracción = 20 x peso de la toma de muestra

Para residuos con un contenido de sólido > a 0,5 %:

$$\text{Peso del reactivo de extracción} = \frac{\text{20 x \% de sólido seco x peso de la toma de muestra}}{\text{100}}$$

Lentamente añada la cantidad del reactivo de extracción al recipiente de extracción. Cierre el frasco herméticamente. Coloque el recipiente en el equipo de agitación rotatorio y haga girar a 30 ± 2 revoluciones por minuto durante 18 ± 2 horas. Si el equipo de agitación no es el recomendado, se debe verificar periódicamente una agitación constante durante las 18 ± 2 horas del proceso de extracción.

La temperatura deberá mantenerse 23 ± 2 °C durante el periodo de extracción.

Conforme la agitación continúa, se pueden generar gases que ejercen presión dentro del frasco extractor, esta generación de presión puede estar asociada al tipo de residuo ensayado, por esta razón es importante tomar en cuenta las características del material e información previa sobre este.

Para aliviar el exceso de presión, el frasco puede abrirse en una campana de extracción periódicamente.

11.3.13. Después de las 18 ± 2 horas de extracción, separar el lixiviado del sólido por medio de filtración a vacío o presión, a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,6 a 0,8 µm.

11.4. Preparación del extracto obtenido.

11.4.1. Si el líquido filtrado resultante en el punto 11.3.3 es miscible con el lixiviado que se generó a partir de la porción solida del residuo, los mismos se deben mezclar en una proporción liquido-sólido igual a la de la muestra. Este líquido combinado se define como el extracto de lixiviación LIXIV B.

11.4.2. Si la fase líquida inicial del residuo, no es miscible con el líquido filtrado resultante del proceso de lixiviación, no combinar las soluciones. Analizar por separado cada solución y combinar los resultados matemáticamente, como se describe en el punto 12.1

11.4.3. Se deberá medir y registrar el pH del extracto de lixiviación LIXIV A. Posteriormente, fraccionar en envases separados el extracto LIXIV A en función de los análisis a realizar. Para el caso del parámetro Cromo VI se deberá filtrar la muestra por filtro de 0.45um y conservar con 600 µL de hidróxido de sodio 5 N y 1 mL de buffer amonio por cada 100 mL de muestra. Para el caso de metales tóxicos y mercurio, la fracción deberá acidificarse con ácido nítrico concentrado hasta un pH menor a 2.

11.4.4. En el caso en que el extracto LIXIV A sea coloreado o la turbidez sea mayor a 1 NTU se deberá proseguir con la digestión ácida antes del análisis de metales, según procedimiento correspondiente.

Nota 4: Realizar por lo menos un ensayo blanco de reactivos de extracción por cada batch.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Si la fase individual resultante del test de lixiviación (LIXIV A) y los líquidos libres del punto 11.3.3 son miscibles entre sí, deberán ser mezclados en una proporción liquido-sólido igual a la de la muestra para ser analizados. Este líquido combinado se define como el extracto de lixiviación LIXIV B.

12.2. Si las fases individuales resultantes del test de lixiviación (LIXIV A) y líquidos libres del punto 11.3.3 no son miscibles entre sí, deberán ser analizadas separadamente. Determinar el volumen de las fases individuales, realizar los análisis requeridos y combinar los resultados matemáticamente, , como se indica en la siguiente formula:

$$\text{Concentración final del constituyente} = \frac{(V1)\,(C1) + (V2)(C2)}{V1 + V2}$$

donde:

V1: corresponde al volumen de la fase 1 (L)

C1: corresponde a la concentración del constituyente de interés en la fase 1 (mg/L)

V2: corresponde al volumen de la fase 2 (L)

C2: corresponde a la concentración del constituyente de interés en la fase 2 (mg/L)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Exactitud:** En caso de contar con material de referencia en matriz, (material con una composición equivalente a la que se va a analizar, a la que se ha agregado una cantidad conocida de (o los) constituyente(s) tóxico(s) que está(n) en estudio para cada tipo de residuo (por ejemplo: lodos del tratamiento de aguas residuales, suelos contaminados, etc.) proceder al análisis de la misma, incluyendo al menos 1 por cada batch. Si esto no es posible se deberán fortificar las muestras, previo a la determinación, seguir los controles de calidad de la metodología de determinación.

13.2. **Precisión:** Se realizarán todas las muestras por duplicado, con el objetivo de evaluar la dispersión de los datos. Se aceptará como máximo un 20 % como rango normalizado.

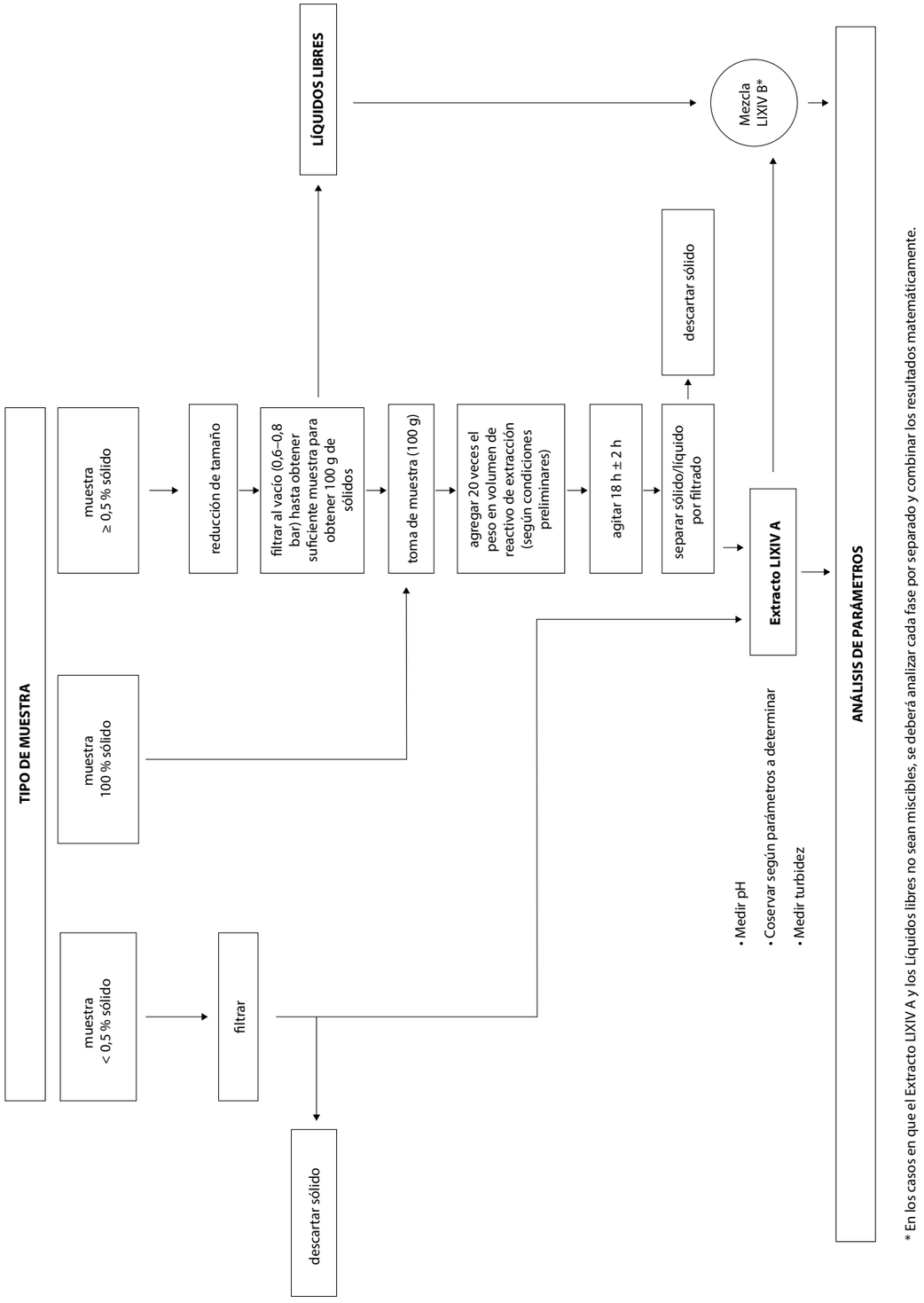
13.3. **Blanco:** Se debe realizar al menos un blanco de reactivos por batch (Reactivo de extracción 1).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. USEPA Method 1311. Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP). Revision 0, July 1992, U.S.A.

14.2. Norma Oficial Mexicana NOM-053-ECOL-1993 Para Control de Residuos Peligrosos que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente. (Publicada en el D.O.F. de fecha 22 de octubre de 1993).

Anexo 1



Anexo 2

Selección de reactivo apropiado

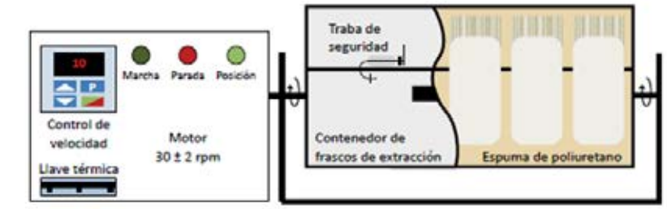
Solución al doble de Ácido acético (CH_3COOH): 11,4 mL CH_3COOH en 1 L de H_2O

Reactivo 1: 1 L de solución al doble de Ácido acético
128,6 mL NaOH, 1N
Llevar a 2 L con H_2O
pH = 4,93 ± 0,05

Reactivo 2: 1 L de solución al doble de Ácido acético
Llevar a 2 L con H_2O
pH = 2,88 ± 0,05

Anexo 3

Equipo de agitación







3262UY

Digestión de matriz sólida en sistema cerrado para la determinación de contenido total de metales

Elaborado - G. Medina

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza en la digestión de suelos, sedimentos y otras matrices sólidas, para la determinación de todos aquellos metales capaces de ser extraídos bajo las condiciones del ensayo (cromo, plomo, mercurio, arsénico, cadmio, cobre, níquel, zinc, entre otros).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Procedimiento: "Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo." (3141UY).

2.6. Procedimiento: "Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos suelos). Método Termogravimétrico." (1050UY).

2.7. Instructivos de uso de balanza (INE 06, INE 96).

2.8. Instructivo de uso de equipo de digestión Antón Paar (INE 71) y ETHOS EASY (INE 130).

2.9. Instructivo para el uso del destilador (INE 109 o INE 36) e instructivo de uso de desionizador. (INE 82)

2.10. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 49).

2.11. Instructivo de uso de estufa de secado (INE 64).

2.12. Hoja de ruta (RIN 06)

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para reducir la interferencia por materia orgánica y extraer todo el metal asociado a partículas a una forma libre, determinable por espectrofotometría de absorción atómica, la muestra es sometida a irradiación de microondas en sistema cerrado. Dicho proceso provoca un rápido calentamiento y un aumento de la presión, dependiente de la materia orgánica presente en la muestra.

3.2. El procedimiento implica la digestión de una toma representativa de muestra (0,3 – 1 g) con 10 mL de ácido nítrico concentrado, en un recipiente cerrado de PFTE, transparente a las microondas y resistente a alta presión. Luego de la digestión, en el caso de analizar mercurio se realiza una oxidación con permanganato de potasio, y una vez frío el sistema, la muestra se lleva a un volumen adecuado para su determinación, se separa el sólido remanente por filtración, centrifugación o decantación, determinándose los metales de interés en la solución sobrenadante.

3.3. Con este método se logra la digestión en menor tiempo que con el método convencional de calentamiento en plancha calefactora en sistema abierto y se minimiza, tanto la contaminación cruzada entre muestras, como la ocasionada por el ambiente del laboratorio. Para el caso de mercurio, el sistema cerrado evita pérdidas de este al ambiente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. El agregado de ácidos se debe realizar bajo campana de extracción de gases.

4.3. El lavado de material con ácido se debe realizar con guantes de plástico resistente a ácidos.

4.4. El mercurio y sus compuestos son muy tóxicos, extremar precauciones cuando se trabaja con muestras y soluciones que lo contengan o pudiesen contenerlo.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Alto contenido de materia orgánica en las muestras, ver (9.3).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno o polipropileno de boca ancha de 500 mL, o en bolsa de muestreo descartable. Si se va a incluir el análisis de mercurio, recolectar la muestra en un frasco de vidrio borosilicato o PTFE de 500 mL con contratapa de PTFE.

6.2. Preservar en heladera a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta su análisis. Tiempo recomendado de análisis antes de los 6 meses, excepto mercurio cuyo tiempo recomendado son 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Digestor de microondas resistente a vapores ácidos con sistema de control de presión y/o temperatura. (Antón Paar Multiwave 3000, ETHOS EASY Milestone, o similar).

7.2. Recipientes de digestión: bombas de teflón con tapa, contratapa para cierre hermético y cierre que contiene la membrana de ruptura o el sistema de seguridad que corresponda al modelo del equipamiento.

7.3. Rotor de posicionamiento de los recipientes y camisas de protección.

7.4. Balanza de resolución 0,001 g.

7.5. Dispensador de ácidos de 10 mL de volumen o pipeta graduada de 10 mL.

7.6. Pipeta automática de 100 a 1000 µL.

7.7. Pipeta automática calibrada de 1000 µL.

7.8. Centrífuga o embudos y filtros de papel Whatman #41, libre de cenizas o equivalente.

7.9. Placas de Petri.

7.10. Mortero y mano de ágata o porcelana.

7.11. Tamiz de polietileno de 2 mm de apertura de poro.

7.12. Tubos plásticos de 10 y 50 mL de capacidad.

7.13. Estufa de secado.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado de mercurio 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico (8.3) en agua destilada (8.1), preparar semestralmente.

8.6. Material de referencia certificado en matriz sedimentos o similar. En el caso de mercurio, deberá contener dicho metal en sus formas orgánicas e inorgánicas.

8.7. Solución de hidroxilamina: disolver 10 g de clorhidrato de hidroxilamina (NH_4OCl Nro. CAS 5470-11-1), Fluka 55459-250G o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Esta solución es estable por 1 mes. 8.9. Solución de permanganato de potasio: 5 g en permanganato de potasio ($KMnO_4$ Nro. CAS 7722-64-7) Merck 1.05082.0250 o equivalente, en 100 mL de agua desionizada (8.2). Preparar previo a la determinación.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o por su nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. En caso del equipo ANTON PAAR Multiwave 3000, cuando se utilice menor número de recipientes de digestión, disminuir la potencia suministrada de forma proporcional por cada recipiente de menos utilizado, tal que la energía emitida sea totalmente absorbida y así evitar daños al magnetrón del equipo, y nunca cargar el rotor con menos de la mitad de su capacidad. Es recomendable usar los espacios vacíos con blancos de reactivos.

9.2. Para el equipo ETHOS EASY en caso de no completar el rotor dejar las camisas de protección en los lugares vacíos. Distribuir homogéneamente los recipientes, y en lo posible utilizar el anillo exterior.

9.3. Alto contenido de materia orgánica (los recipientes de digestión admiten hasta 0,5 g de materia orgánica), o sustancias como carbonatos, que en presencia de ácidos generan gases, provocará un aumento importante de la presión en el interior del recipiente de digestión. Para estas muestras, una vez acidificadas, esperar hasta que no se desprendan más gases para cerrar los recipientes de digestión.

9.4. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución (8.4), mínimo 12 horas. Luego enjuagar tres veces con agua desionizada (8.2) y secar en estufa a 100 °C. Los materiales utilizados para el análisis de mercurio, luego de lavado, deberán ser enjuagados por inmersión en solución (8.5) durante 12 h y luego enjuagar tres veces con agua desionizada (8.2) y secar en estufa a 100 °C. Este material se mantiene identificado para tal fin.

9.5. Manejar las muestras en el sector de tratamiento de metales.

9.6. El equipo generador de microondas está diseñado para este fin específico, contando con los sistemas de seguridad necesarios.

9.7. Todos los recipientes y accesorios de digestión deben estar secos y libres de partículas para evitar puntos de calentamiento que pueda dañarlos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Para mercurio se deberá tomar como referencia el procedimiento “Determinación de Mercurio orgánico e inorgánico en matrices ambientales digeridas. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de Vapor Frío con sistema de inyección de Flujo, 3141UY.”(2.5). Para el resto de los metales no corresponde.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Si la toma de muestra se va a realizar en seco, tomar una cantidad representativa de la muestra (aprox. 100 g), colocar en una placa de Petri y llevar a una estufa a 105 °C (para el caso del análisis de mercurio la temperatura debe ser menor a 60 °C), hasta peso constante. Previo al secado, retirar de la muestra cualquier componente ajeno al suelo y/o sedimento; como fracciones de roca de tamaño superior a 2 mm, así como hojas, tallos y raíces.

11.2. Una vez seca la muestra es molida en un mortero teniendo la precaución de no romper fracciones de roca de tamaño superior a 2 mm, las mismas deben ser separadas previo a la molienda. La muestra una vez molida es tamizada y homogeneizada, esta última operación de ser necesario, puede ser realizada en mortero. Finalizado dicho procedimiento la muestra es colocada en un desecador hasta su digestión.

11.3. En caso de tener que realizar la toma de muestra húmeda, previo a la pesada determinar el porcentaje de humedad de la misma según (2.6). Considerar en el momento de realizar la toma la dilución producida por el contenido de humedad de la misma.

Nota 3: Si las características físicas de las muestras lo permiten, las mismas pueden ser tamizadas previo al secado.

11.4. Determinar el peso del recipiente de digestión con una precisión de 1 mg (P1). Registrar en la hoja de ruta (2.12)

11.5. Tarar la balanza y realizar una toma de aproximadamente 0,3 – 1 g de muestra, registrar el peso de muestra (P2).

11.6. Agregar, 10 mL de ácido nítrico concentrado 8.3.

11.7. Incluir en cada set de digestión un material de referencia de matriz (8.6) y un blanco de reactivo.

11.8. Luego de colocar los recipientes de digestión dentro del equipo, seguir las instrucciones definidas en el instructivo del digestor de microondas a ser utilizado.

11.9. Correr el programa. Si el programa se corta, no apagar el equipo ya que se activa el sistema de enfriamiento.

11.10. Agregar aproximadamente 20 mL de agua desionizada y pesar la bomba con la muestra digerida (P3).

11.11. Dejar decantar el sólido remanente luego de la digestión. De no ser posible la separación del sólido por decantación, centrifugar o filtrar con papel de filtro y pasar la solución obtenida a tubos de plástico, donde será almacenada hasta su determinación.

11.12. Medir la densidad de la muestra digerida, pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1,0 mL (IN 407 o equivalente). Registrar en la ruta de análisis correspondiente (RIN 06).

Nota 4: Según bibliografía, el plomo en material particulado ambiental, se distribuye homogéneamente en el papel de filtro. Sin embargo cuando se realiza el muestreo cerca de carreteras se observa variabilidad a lo largo del filtro por lo que es necesario analizar trozos de papel adicionales por cada exposición.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular el volumen final de digestión según:

$$V_F\ (mL) = (P_3 - P_2 - P_1) / d$$

donde:

P_1: corresponde al peso del recipiente de digestión con su tapa, en g.

P_2: corresponde al peso de muestra, en g.

P_3: corresponde al peso del recipiente de digestión, con su tapa más muestra y reactivos luego de la digestión, en g.

d: corresponde a la densidad del digesto en g/mL.

Realizar la determinación como lo establece el procedimiento correspondiente según el metal a determinar.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** digerir simultáneamente con las muestras, un material de referencia (8.6). Tener en cuenta que de esta forma se determina la exactitud de la digestión más la determinación. Para el análisis de mercurio se deberá tomar como referencia el procedimiento (2.7).

13.2. **Control de la precisión:** todas las determinaciones deben realizarse por duplicado. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de lo indicado en el procedimiento de determinación del metal correspondiente.

13.3. **Blanco de digestión:** realizar un blanco de reactivos con cada digestión. Para el análisis de mercurio, el control del blanco coincide con el punto de concentración cero de la curva. Esto es debido a que la curva de calibración es digerida junto con la muestra.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Kingston. H.M.Jassie, eds. 1988. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and practice. American Chemical Soc. Washington, D.C.

14.2. USEPA. 1990. Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. SW-846 Method 3051. USEPA. Washington, D.C.

14.3. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Métodos 3030 D Digestion for metals y 3030 K Microwave-assisted digestión, pp 194 a 195 y 198 a 200.

14.4. EPA, Method 7471B Mercury in Solid or Semisolid Wastes (Manual Cold-Vapor Technique), February 2007, Revision 2.

14.5. Manual de instrucciones - Antón Paar Multiwave 3000, Sistema de reacción por microondas.

14.6. Instructivo de uso de digestor de microondas ETHOS EASY Maxi-44 (INE 130).

3276UY

Cálculo de concentración utilizando adiciones estándar para muestras en las cuales se constató efecto matriz

Elaborado - N. Barboza

Modificado - A. Mangarelli

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para calcular la concentración de los distintos metales en muestras donde se constató, mediante el procedimiento correspondiente, la existencia de efecto matriz.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Instructivos de uso del destilador para la preparación de agua destilada (INE 109).

2.5. Instructivos de uso del desionizador para la preparación de agua desionizada (INE 121).

2.6. Ruta de análisis (RIN 22).

2.7. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La presencia de interferencias multiplicativas en una muestra se determina comparando las pendientes entre una curva de calibración preparada con estándares (sin interferencia), y la curva de la muestra adicionada. Si las pendientes son significativamente diferentes, según un ensayo estadístico adecuado (Ver 14.2), se puede concluir que existe efecto matriz.

3.2. Para calcular la concentración de los diferentes metales, en muestras con efecto multiplicativo de matriz, se realiza una curva de fortificación. Los puntos de dicha curva serán las absorbancias de las muestras adicionadas, con diferentes cantidades conocidas de estándar, en función del volumen o cantidad conocida del estándar adicionado.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. No aplica.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. No aplica.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

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

8.3. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2): ácido nítrico concentrado al 65 %, d = 1,40 g/mL, Merck 1.00456 o equivalente.

8.4. Solución de ácido nítrico para lavado 50 %: solución al 50 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.5. Solución de ácido nítrico para lavado 20 %: solución al 20 % v/v de ácido nítrico 8.3 en agua destilada 8.1, preparar anualmente.

8.6. Solución estándar de 1000 mg/L del metal a determinar.

8.7. Solución estándar de 100 mg/L del metal a determinar.

8.8. Acetileno de alta pureza (C_2H_2, Nro. CAS 74-86-2), calidad mínima 99,5 %.

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar contaminación de la muestra durante la manipulación.

9.2. Todo el material de plástico y vidrio utilizado para el análisis, luego de lavado, deberá enjuagarse por inmersión en solución 8.5, mínimo 12 horas. Este material se mantiene identificado para tal fin.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Realizar tomas preestablecidas de la muestra digerida según la concentración estimada en el análisis del metal correspondiente. Se deben de tomar las mismas cantidades en todos los puntos de la curva, para que la dilución de la matriz sea la misma en todos los tubos.

11.2. Adicionar a cada tubo un volumen determinado de una solución estándar del metal correspondiente de manera de obtener una curva de concentración. Los volúmenes seleccionados deben permitir que en la muestra fortificada con la menor concentración se observe una lectura de absorbancia detectable. El mayor punto debe de estar dentro de la escala lineal del instrumento.

11.3. Llevar los tubos a volumen de manera que el efecto matriz en todos los puntos de la curva sea el mismo.

11.4. Preparar al menos 6 puntos de curva de calibración, incluyendo un cero. Leer las absorbancias a la longitud de onda correspondiente para el metal a determinar. Ver el procedimiento específico de determinación para el metal a determinar.

Nota 3: Se asume densidad de muestras acuosas de 1 g/mL. En caso contrario calcular como el volumen que descarga una pipeta calibrada, en g, sobre el volumen nominal de la pipeta en mL (g/mL). Corregir la toma de muestra y la toma final.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Graficar Absorbancia en función de los volúmenes de estándar agregado.

12.2. Determinar la ecuación de la curva.

$$A = pV_s + o$$

donde:

A: corresponde a las absorbancias en UA

p: corresponde a la pendiente de la curva

V_s: corresponde al volumen agregado de estándar (mL)

o: corresponde a la ordenada en el origen

Donde la pendiente (p) y la ordenada en el origen (o) vienen dadas por:

$$p = \frac{\varepsilon\, b\, C_s}{V_t} \qquad o = \frac{\varepsilon\, b\, V_0\, C_A}{Vt}$$

donde:

ε: corresponde a la absortividad molar en [L/(mol cm)]

b: corresponde a la longitud de la cubeta en cm

Ca: corresponde a la concentración de la muestra en (moles/L)

Cs: corresponde a la concentración del estándar en (moles/L)

V_0: corresponde al volumen de muestra usado en (L)

V_t: corresponde al volumen total o final de la dilución (L)

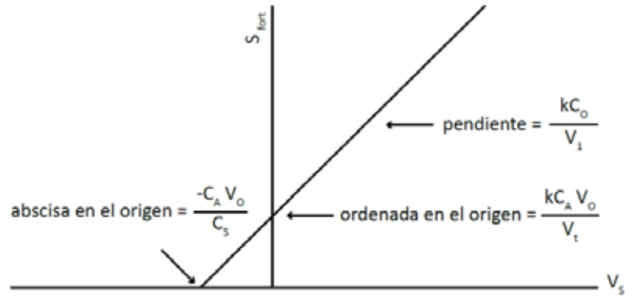
12.3. La abscisa en el origen es el valor Vs cuando la señal de absorbancia es cero, por lo que la abscisa en el origen es o/p y con esto se determina la concentración de la muestra problema.

O sea:

$$\frac{O}{p} = \frac{V_o\, C_A}{C_s} \qquad \text{y} \qquad C_A = \frac{O\, C_s}{p\, V_o}$$

Pudiendo estar la concentración en unidades de mg/L y volumen en L, u otras unidades, siempre que sean compatibles entre sí.

Ejemplos de curvas de calibración para el método de adición de patrón



A) La señal se representa en función del volumen patrón añadido

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. El R^2 de la curva, debe de ser mayor o igual a 0,99. De lo contrario repetir la operación.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. SKOOG/LEARY. Análisis Instrumental, 4ª Edición, 1994. Sección 8D-2, pp 187-189.

14.2. MILLER/MILLER. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ª Edición, 2002.

3281UY

Digestión de muestras sólidas para la determinación de Cromo VI

Elaborado – V. Muñoz

Modificado – M. Martínez

Revisado – A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado – N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para la extracción de Cr VI de suelos, lodos, sedimentos y residuos sólidos, para su posterior determinación mediante espectrofotometría en base al procedimiento 3164UY.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento "Determinación de pH en suelo y residuos" (1016UY).

2.6. Procedimiento "Determinación de potencial oxido-reductor en matrices sólidas". (1025UY).

2.7. Procedimiento "Determinación de humedad en muestras sólidas". (1050UY).

2.8. Instructivo de uso de balanza de plato abierto (INE06).

2.9. Instructivos de uso del destilador para la preparación de agua destilada (INE 109).

2.10. Instructivo de uso del desionizador para la preparación de agua desionizada (INE 121).

2.11. Instructivo de uso de baño con agitación (INE68).

2.12. Instructivo de uso de Analizador de iones (INE10).

2.13. Ruta de análisis (RIN 15).

2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Mediante una digestión alcalina se solubilizan los compuestos insolubles de Cr VI en agua. El pH debe estar controlado para lo cual se usa un buffer de 0,5 M K_2HPO_4 /0,5 M KH_2PO_4. Se digiere a 90-95 °C durante 1 hora lo cual permite disolver los compuestos de Cr VI insolubles. Al pH de trabajo y mediante el agregado de Mg+2 en buffer fosfato, se previene la disolución de compuestos de Cr III y su posterior oxidación a Cr VI.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar lentes de seguridad, guantes y túnica.

4.2. Siempre que fuese necesario el agregado de ácido, realizarlo bajo campana de extracción de gases.

4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El potencial redox y el pH de la muestra son determinantes para la existencia de Cr VI en la misma, es así que en muestras con alto poder reductor, el agregado de Cr VI en la fortificación no se recupera ya que éste pasa a Cr III. Medir el pH y el potencial redox siguiendo los procedimientos establecidos y usar el gráfico incluido en el anexo, para determinar el poder reductor de la muestra.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en bolsas de muestreo de plástico descartable. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Analizar antes de los 30 días del muestreo. Luego de digerido analizar antes de 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Baño de agua con agitación (IN309)

7.2. Recipientes de digestión: tubos de vidrio con tapa rosca o Erlenmeyers de 250 mL cubiertos con vidrio de reloj

7.3. Matraz Erlenmeyers de 1 L

7.4. Matraces de 100 y 1000 mL.
7.5. Balanza de resolución de 0,001 g.
7.6. Pipeta calibrada de 1mL.
7.7. Filtros de membrana de 0,45 µm de celulosa o policarbonato. Equipo de filtración o jeringas descartables.
7.8. Analizador de iones con electrodo de pH y electrodo combinado platino - referencia (Orion 96- 78).
7.9. Agitador magnético.
7.10. Tubos de plástico de 50 mL.
7.11. Termómetro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada grado 3 (según ISO 3696 en su versión vigente).
8.2. Agua desionizada grado 2 (según ISO 3696 en su versión vigente).
8.3. Cloruro de magnesio $MgCl_2$ anhidro Nro. CAS 7786-30-3 (puede ser utilizado $MgCl_2$ hexahidrato si es corregida toma tomando en cuenta los pesos moleculares).
8.4. Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4
8.5. Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0
8.6. Buffer fosfato: disolver 87,09 g de K_2HPO_4 PA y 68,04 g de KH_2PO_4 PA en 1 L de agua desionizada.
8.7. Cromato de plomo $PbCrO_4$ Nro. CAS 7758-97-6
8.8. Hidróxido de sodio NaOH Nro. CAS 1310-73-2
8.9. Carbonato de sodio anhidro Na_2CO_3 Nro. CAS 497-19-8
8.10. Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ Nro. CAS 7778-50-9
8.11. Solución de digestión: disolver 20,0 g ± 0,05 g de NaOH y 30,0 g ± 0,05 g de Na_2CO_3 anhidro en 1 L de agua 8.2, preparar mensualmente. El pH debe ser mayor a 11,5.
8.12. Solución comercial de Cr VI o solución de Cr VI 1000 mg/L preparada de la siguiente manera: disolver 2,829 g de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ (Nro. CAS 7778-50-9) secado previamente en estufa a 105 °C con agua desionizada en un matraz de 1000 mL.
8.13. Para fortificar preparar solución de Cr VI de 100 mg/L realizando una toma de 10 mL de la solución 8.12 y llevando a 100 mL con agua desionizada.
8.14. Ácido nítrico 65 % HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2
8.15. Ácido clorhídrico 37 % HCl Nro. CAS 7647-01-0
8.16. Solución para lavado de material: preparar una solución de ácido nítrico: ácido clorhídrico: agua en proporciones 1:2:9. Verificar que el ácido nítrico no tenga color amarillo, ya que dicho color indica la fotoreducción de NO^{3-} a NO^{2-}, el cual es un agente reductor de Cr VI.

Nota 1: Salvo que se especifique, deben emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material de plástico y vidrio utilizado, luego de lavado, deberá ser enjuagado por inmersión en la solución 8.15 durante 12 horas. Este material se mantiene identificado para tal fin.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Registrar en RIN 15 la masa del recipiente de digestión con su tapa.
11.2. Homogeneizar la muestra y realizar una toma de hasta 2,5 g. Registrar la toma de muestra en la planilla correspondiente. Fortificar una toma de muestra de cada matriz, adicionando 1,0 mL de solución 8.12 (Cr VI soluble) o 2 veces la concentración estimada en la muestra (la mayor de estas dos opciones). A la otra toma, fortificarla adicionando de 10 a 20 mg del reactivo 8.7 (Cr VI insoluble).

11.3. Agregar 50 ± 1 mL de solución 8.11, 400 mg de $MgCl_2$ anhidro o 850 mg del $MgCl_2$ hexahidratado y 0,5 mL de buffer fosfato 8.6.
11.4. Realizar por lo menos un blanco de reactivos por batch.
11.5. Cerrar los frascos, agitarlos vigorosamente durante 5 minutos.
11.6. Controlar que el agua en el baño esté a 90 – 95 °C. Colocar los frascos de digestión y encender la agitación. Periódicamente agitarlos manualmente. Controlar el nivel del agua del baño, en caso de ser necesario agregar agua caliente de manera de mantener la temperatura de la digestión.
11.7. Mantener los frascos a la temperatura indicada en el punto anterior durante una hora. Luego dejar enfriar los frascos hasta temperatura ambiente agitando periódicamente. Finalmente pesar los frascos de digestión y registrar el peso en la planilla correspondiente.
11.8. Medir la densidad de la solución pesando lo que descarga una pipeta calibrada de 1mL.
11.9. Filtrar el digesto y colocar la solución obtenida en un tubo de plástico.
11.10. Mantener los tubos de plástico refrigerados a 4 °C ± 2 °C hasta su medida, momento en el cual se ajusta al pH que indique el procedimiento de determinación.
11.11. Si luego de la determinación no se cumple 13.1, medir el pH y el potencial redox de la muestra de acuerdo a lo especificado en el procedimiento 1025UY “Determinación de Potencial Óxido-Reductor en matrices líquidas y sólidas” y el procedimiento 1016UY “Determinación de pH en suelos y residuos ”. Si el par de valores, potencial (Eh) y pH se encuentra por debajo de la curva del par $HCrO_4$ -/$Cr(OH)_3$ en el grafico anexo, esto indica que el suelo es reductor para Cr VI. En este caso se desestiman los valores de recuperación fuera de rango.
11.12. La determinación del porcentaje de humedad de la muestra solida se determina según el procedimiento 1050UY.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Cálculo de masa de digesto:

$$Mf\ (g) = Md - Mr - T$$

donde:
Mf (g): corresponde a la masa de digesto
Md (g): corresponde a la masa final de digestión (medido en punto 11.7)
Mr (g): corresponde a la masa del recipiente de digestión (medida en punto 11.1)
T (g): corresponde a la toma de muestra (punto 11.2)

12.2. Cálculo de factor de corrección por humedad de la muestra:

$$Fh = \frac{Ms - Mp}{Mh - Mp}$$

donde:
Fh: corresponde al factor de corrección por humedad de la muestra, para obtener concentración en de Cr VI en mg/kg de muestra en base seca.
Mp: corresponde a la masa de placa de Petri (punto 11.12)
Ms: corresponde a la masa de placa + muestra luego del secado (11.12)
Mh: corresponde a la masa de placa + muestra antes del secado (11.13)

12.3. Cálculo de % de Recuperación para el caso de fortificar con Cr VI soluble (dicromato de potasio):

$$\% R = 100 \times (Cmf \times (mm1 + mfort) - ((Cm \times mm1)/mfort)) \times 1E\text{-}6$$

donde:
Cmf: corresponde a la concentración de CrVI en el sólido fortificado (mg/kg)
mm1: corresponde a la masa de muestra sólida utilizada en la digestión de la muestra fortificada (g)
mfort: Concentración del estándar de fortificación (mg/L) x Volumen de estándar (L)
Cm: corresponde a la concentración de Cr VI en el sólido sin fortificar (mg/kg)

12.4. Cálculo de % Recuperación para el caso de fortificar con cromato de plomo:

$$\% R = 100 \times (Cmf \times (mm1 + mfort)) - ((Cm \times mm1)/(mfort \times PA/PM)) \times 1E\text{-}6$$

donde:
Cmf: corresponde a la concentración de Cr VI en el sólido fortificado (mg/kg)
mm1: corresponde a la masa de muestra sólida utilizada en la digestión de la muestra fortificada (g)
mfort: corresponde a la masa de $PbCrO_4$ (g)
Cm: corresponde a la concentración de Cr VI en el sólido sin fortificar (mg/kg)
PA: corresponde al peso atómico de Cr VI (51,996 g/mol)
PM: corresponde al peso molecular $PbCrO_4$ (323,182 g/mol)

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de recuperación:** realizar al menos una fortificación en cada matriz. Control de recuperación con $PbCrO_4$ (CrVI insoluble) $K_2Cr_2O_7$ (CrVI soluble) la recuperación debe estar en el rango de 75-125%.

13.2. **Material de referencia:** en caso de contar con un material de referencia, la recuperación del valor de referencia debe estar entre el rango de 80-120 %.

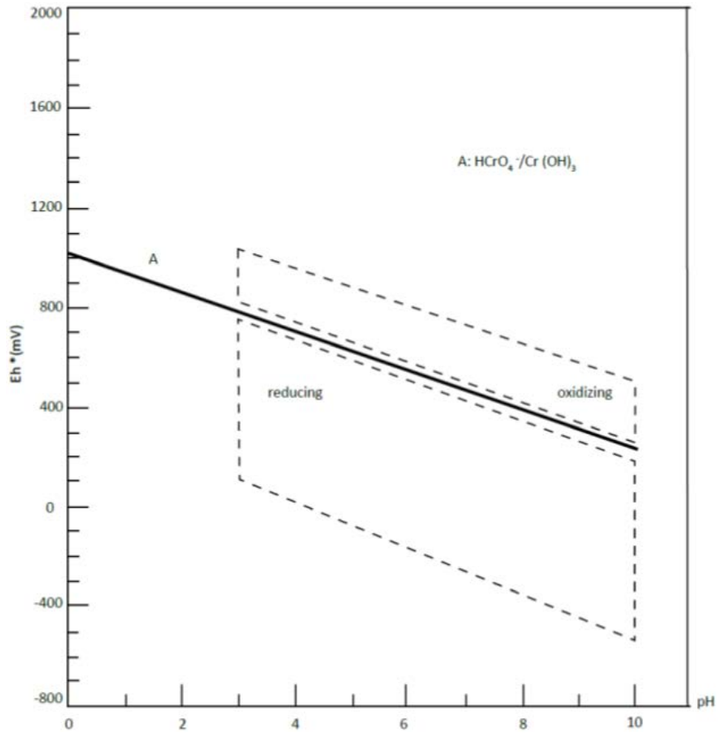
13.3. **Control de la precisión:** realizar un duplicado en cada matriz. Verificar que la dispersión de los rangos normalizados sea menor al 20 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. USEPA Method 3060A “Alkaline digestion for hexavalent chromium” SW 846, 1996.
14.2. USEPA Method 9045D “Soil and Waste pH” SW 846, 2004.

Anexo: Diagrama potencial redox/pH

Las líneas punteadas definen el Eh-pH habitual en suelos y sedimentos



SECCIÓN 4
Inorgánicos no metálicos

4004UY

Determinación de amonio en agua y efluentes

Flow Injection Analysis (FIA)

Elaborado - E. Broggi

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de amonio en aguas naturales, salobres o salinas y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango lineal es (0,013 – 2,0) mg NH_4^+-N/L y el rango de trabajo es de (0,013 – 100) mg NH_4^+-N/L. Es posible ampliar el rango de trabajo por dilución de la muestra. El límite de detección es de 0,0044 mg NH_4^+-N/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 78)

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A, INE 16B, INE 06, INE 115)

2.7. Instructivo de uso del equipo de destilación (INE 136)

2.8. Instructivo de uso de prensa para tubos de destilación (INE 137)

2.9. Ruta de análisis (RFQ 28)

2.10. Instructivos de uso de destilador y desionizador de agua (INE 109, INE 121)

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método se basa en la reacción de Berthelot. El amonio reacciona con el fenol alcalino e hipoclorito de sodio para formar azul de indofenol. El nitroprusiato de sodio es añadido para aumentar la sensibilidad. La absorbancia del producto de reacción es medida a 630 nm y es directamente proporcional a la concentración de amonio original en las muestras. Para efluentes industriales puede requerirse de una destilación previa con ácido sulfúrico y borato de sodio, para eliminar interferencias de la matriz.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. Los siguientes reactivos tienen potencial de ser altamente tóxicos o peligrosos: fenol y nitroprusiato de sodio.

Nota 1: para evitar el olor del fenol en el ambiente donde se encuentra el FIAS se recomienda tapar con Parafilm el recipiente del reactivo de fenolato de sodio y el de descarte.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los iones calcio y magnesio pueden precipitar si se encuentran en altas concentraciones. Se añade EDTA en línea a la muestra para prevenir la precipitación.

5.2. El color, la turbidez y ciertas especies orgánicas pueden causar interferencias. La turbidez es removida por filtración con filtro de 0,45 µm de tamaño de poro. El color de la muestra puede ser corregido corriendo las muestras en el equipo sin desarrollo de color o por dilución de la muestra.

5.3. Pueden existir interferencias por contaminación del agua desionizada, los reactivos, material de vidrio u otros materiales utilizados en la preparación de las muestras por lo cual se debe prestar mucha importancia a la limpieza de todo el material.

5.4. Según indicaciones del fabricante, los tubos utilizados para la destilación pueden contener hasta 0.015 mgN en 6mL de destilado, por lo que se recomienda enjuagar el material con agua desionizada antes de utilizar.

5.5. Eliminar cualquier diferencia marcada en el pH de las muestras dado que la intensidad del color es dependiente del mismo.

5.6. El cloro residual puede causar interferencia. Para muestras que presenten valores superiores o iguales a 1mgCl/L remover con la solución 8.10. 1mL de dicha solución remueve 1 mg/L de cloro residual en 500mL de muestra.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar al menos 250mL de muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y refrigerar ≤ 6 °C (> 0 °C). Las muestras de agua natural que no requieren destilación previa a la determinación deben ser filtradas por filtro de 0,45 µm de tamaño de poro.

6.2. Los efluentes se realizan con dilución 1 en 10 o superior (máximo 1 en 50).

6.3. Realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.

6.4. De no ser posible congelar la muestra a -20 °C y analizarla antes de los 28 días.

Nota 2: la preservación de las muestras por acidificación no es aplicable a esta metodología de la forma en que está presentada.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,001 g.

7.2. Balanza de resolución de 0,01 g.

7.3. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 - 10,00) mL, (20 – 100) µL y (100 – 1000) µL.

7.4. Matraces aforados de 100mL.

7.5. Matraces Erlenmeyer de 150 o 250mL.

7.6. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de manifold para la determinación de amonio (LACHAT QuickChem 8500 o similar)

7.7. Equipo de destilación de muestras (LACHAT Micro Dist o similar)

7.8. Tubos de destilación.

7.9. Prensa para tubos de destilación.

7.10. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL o 1000 mL.

7.11. Bomba de vacío.

7.12. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01)

8.2. **Fenol**: (C_6H_5OH Nro. CAS 108-95-2) en un matraz Erlenmeyer verter 88,8 g de agua desionizada y agregar 8,3g de fenol cristalino. Mientras se agita con agitador magnético agregar 3,2 g de hidróxido de sodio. Enfriar la solución y agitar circularmente para homogeneizar. NO DESGASEAR ESTE REACTIVO.

8.3. **Hipoclorito de sodio:** (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9) en un matraz Erlenmeyer verter 25g de hipoclorito de sodio comercial 100 g de cloro activo por litro, y agregar 75 g de agua desionizada.

8.4. **Nitroprusiato de sodio:** $[Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$ Nro. CAS 13755-38-9] en un matraz Erlenmeyer pesar 0,35 g de nitroprusiato de sodio y agregar 100 g de agua desionizada.

8.5. **Hidróxido de sodio 1M:** (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) en un matraz aforado de 100mL. agregar 4,00 g de hidróxido de sodio sólido y 75mL de agua 8.1. Disolver, enfriar y completar los 100mL con agua desionizada.

8.6. **Buffer de agente quelante:** en un matraz aforado de 100mL pesar 5,00g de EDTA disódico ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) y agregar 70mL de agua desionizada y 22,5mL de solución de hidróxido de sodio 1 M. Disolver con agitador magnético y completar los 100mL con agua desionizada.

8.7. **Ácido sulfúrico 0,016M (solución captura para destilación):** en un matraz aforado de 100mL agregar 90µL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) con pipeta automática verificada en 80mL de agua desionizada. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

8.8. **Hidróxido de sodio 0,1M (destilación):** (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) en un matraz aforado de 100mL agregar 0,40 g de hidróxido de sodio sólido y 75mL de agua desionizada. Disolver, diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

8.9. **Buffer Borato de Sodio 0,011M (destilación):** ($Na_2B_4O_7.10H_2O$ Nro. CAS 1303-96-4) en un matraz Erlenmeyer de 100mL, agregar 0,42 g de borato de sodio decahidratado, 3,6mL de reactivo 8.8 en 96,4mL de agua desionizada. Agitar para mezclar.

8.10. **Solución Tiosulfato de sodio:** ($Na_2S_2O_3.5H_2O$ Nro. CAS 1762-95-4) en un matraz aforado de 1L, agregar 3,5 g de tiosulfato de sodio pentahidratado en 800mL de agua desionizada. Disolver, diluir hasta el aforo e invertir para mezclar. Preparar semanalmente.

8.11. **Solución estándar de amonio de 1000 mg N/L:** (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) en un matraz aforado de 1L disolver 3.819 g de cloruro de amonio que es previamente secado en estufa durante 2 horas a 110°C. en aproximadamente 800mL de agua desionizada. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar. Es posible usar MRC de concentración similar.

8.12. **Solución control de amonio de 200 mg N/L:** (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) en un matraz aforado de 500mL disolver 0,3819 g de cloruro de amonio que es previamente secado en estufa durante 2 horas a 110 °C en aproximadamente 400mL de agua desioinizada. Diluir hasta el aforo el invertir para mezclar. Es posible usar MRC de concentración similar que deberá ser independiente al 8.11.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de estándares de al menos 5 concentraciones, incluyendo el blanco de acuerdo al siguiente cuadro y con una resolución de 0,001 g, a partir de un estándar de 10mgN/L preparado a partir de material de referencia certificado o de la solución 8.11:

Conc. Std. (mg NH_4-N/L)	Masa std (g)	Masa fin (g)	Conc. aprox. fin (mg NH_4-N/L)
10,0	10,0	50,0	2,0
10,0	7,50	50,0	1,5
10,0	5,00	50,0	1,0
10,0	2,50	50,0	0,50
10,0	0,500	50,0	0,10
10,0	0,250	50,0	0,050
10,0	0,125	50,0	0,025
10,0	0,075	50,0	0,015
---	0,000	50,0	0,000

Nota 3: Se asume una densidad de 1 g/mL.

10.2. Preparar una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de un material de referencia certificado o de la solución 8.12:

Conc. Std. (mg NH_4-N/L)	Masa sol. control (g)	Masa fin (g)	Conc. aprox. fin (mg NH_4-N/L)
200	0,150	50,0	0,600

Nota 4: Se asume una densidad de 1 g/mL

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Las muestras de **agua natural** se analizan sin dilución. Realizar la determinación según punto 11.4

11.2. **Efluentes sin destilación**

Se realiza una dilución de 1 en 10 o superior (máximo 1 en 50), dejando registro de las tomas en la hoja de ruta. Si por características de la muestra, se requiere de una dilución mayor, se podrán realizar diluciones seriadas. Realizar la determinación según punto 11.4

11.3. **Efluentes y muestras complejas (destilación):**

11.3.1 Para las muestras de efluentes o muestras complejas que requieren destilación previa a la determinación instrumental, se aconseja realizar una dilución de 50 veces. Si la muestra lo requiere se pueden realizar distintas diluciones. Luego de realizar la destilación y las diluciones correspondientes proceder punto 11.4 para realizar la determinación.

11.3.2 Colocar los tubos de recogida, con la "M" hacia arriba en la gradilla correspondiente y agregar con pipeta automática verificada 1,00mL del reactivo 8.7. Tapar la parte superior de los tubos de recogida colocando la membrana correspondiente y luego el tapón.

11.3.3 Colocar los tubos de muestra en la gradilla correspondiente y agregar con pipeta automática verificada 6,00mL de muestra. De la misma manera proceder con el blanco y los duplicados.

11.3.4 Para las muestras fortificadas repetir el punto 11.3.2 tomando en cuenta que se debe tarar el peso del tubo, registrar el peso de la muestra agregada y el agregado de la solución de fortificación. Todos estos datos se deben registrar en el RFQ 28.

11.3.5 Agregar a todos los tubos de muestra 0,75mL del reactivo 8.9 con pipeta automática verificada.

11.3.6 Montar y prensar los tubos de destilación según INE 137.

11.3.7 Luego de tener todos los tubos listos, proceder a colocar los tubos en el destilador y encender el equipo según INE 136. Programar en el timer 30 minutos.

11.3.8 Finalizada la destilación apagar el equipo según INE 136, utilizando los guantes ignífugos retirando uno a uno los tubos del equipo, transcurridos 4 segundos presionar hacia abajo y girar el tubo de muestra para retirarlo del tubo de recogida. (Este paso es fundamental para evitar pérdidas del destilado). Desechar la muestra caliente y el tubo de muestra. Invertir el tubo de recogida de manera que el extremo "D" quede hacia arriba. Colocar los tubos en su gradilla correspondiente y dejar enfriar por al menos 10 minutos.

11.3.9 Transcurridos los 10 minutos, retirar el tubo de la gradilla manteniéndolo en posición horizontal y haciendo girar lentamente para hacer llegar todas las gotas a sus extremos. Luego colocarlo en posición vertical con el extremo "D" hacia arriba dando pequeños golpecitos en las paredes del tubo de recogida si fuera necesario para que las gotas se desplacen hacia abajo hasta el extremo "D". Repetir este punto para todos los tubos de recogida.

11.3.10 Separar el extremo "D" con las manos y desecharlo de manera de quedarnos con el extremo que tiene la "M", agregar agua desionizada hasta la marca de 6,0mL, agitar suavemente para mezclar y tapar con parafilm. Repetir este punto para todos los tubos.

11.4. **Determinación instrumental:**

11.4.1. Encender el equipo de inyección en flujo.

11.4.2. Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua desionizada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

11.4.3. Verificar que el calentador del manifold esté seteado a 60 °C. Nunca trabajar con el calentador encendido sin hacer pasar líquido a través del mismo.

11.4.4. Colocar uno a uno y en el orden que aparecen en el manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar a la temperatura de trabajo por unos 10 minutos.

11.4.5. Colocar un blanco de agua desionizada, los estándares de la curva de calibración y el control en los tubos del rack del autosampler en el orden apropiado. Se recomienda comenzar con el blanco de agua 8.1 y luego del estándar de menor a mayor concentración.

11.4.6. Verificar en el computador, en el ícono de la configuración del instrumento, que esté correctamente seteado el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.

11.4.7. Colocar una porción de cada muestra a analizar en los tubos del rack del autosampler.

11.4.8. Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.

11.4.9. No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.

11.4.10. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración Área en función de la Concentración y calcula la concentración de los controles y las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no ha habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.

12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

12.5. En caso de constatar blancos detectables se procederá a restar su aporte, lo cual está considerado en la planilla de cálculo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo a la tabla del punto 10.2. Analizar el control en la secuencia luego de la curva de calibración, cada 3 muestras de efluentes o 5 muestras de aguas, y al final de toda la secuencia. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación establecidos en el gráfico de control. Si algún resultado está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control curva de calibración:** Se realiza inspección visual aceptando un R^2 mínimo de 0,995 y por lo menos 5 puntos incluyendo el blanco como uno de ellos.

13.3. **Control de la precisión:** Realizar una inyección por duplicado de una de cada cinco muestras tanto para aguas como para efluentes. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado. Para muestras de aguas naturales contrastar que los valores obtenidos se encuentren bajo control estadístico según gráfico de control. Para efluentes contrastar los valores obtenidos con el criterio de aceptación correspondiente, siendo este un 15 % hasta obtener datos suficientes para construir el gráfico de control.

Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.4. **Porcentaje de recuperación:** Para muestras de agua natural pesar aproximadamente 30 g de la muestra a ser analizada y fortificar con 100 µL de una dilución de material de referencia o con la solución preparada según punto 8.12. Se fortifica una de cada 5 muestras de agua. Contrastar que los porcentajes obtenidos de la planilla de cálculo se encuentren bajo control estadístico según gráfico de control.

Para efluentes proceder según punto 11.2, fortificando todas las muestras con 100 µL de una dilución de material de referencia o con la solución preparada según punto 8.12.

Contrastar los porcentajes obtenidos de la planilla de cálculo con los criterios de aceptación correspondientes, siendo estos (80 - 120) % hasta obtener datos suficientes para construir el gráfico de control. Cuando el porcentaje de recuperación de la adición, no se encuentre dentro de los límites de control y el valor a reportar este en el entorno de 5mgN/L ± 20%, se deberá repetir el análisis según 11.3 (con destilación previa). Si la concentración preliminar está fuera de dicho rango, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. LACHAT, QuikChem® Method 10-107-06-1-J, Determination of ammonia by flow injection analysis.

14.2. American Public Health Association (APHA) (2023) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500-NH3 A, B y H Flow Injection Analysis pp. 4-424 a 4-425, 4-431 a 4-433.

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 - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

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 (salinidad >0,5‰).

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 µg PO_{4-} P/L a 500 µgPO_{4-} P/L. El límite de detección es de 3,6 µg PO_{4-} P/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de Mantenimiento y Control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso balanza de resolución 0,01 g (INE 16A, INE 16B).

2.6. Instructivo de uso balanza analítica de resolución 0,0001 g (INE 15) o de resolución 0,001 (INE115).

2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 145).

2.8. Ruta de análisis (RFQ 11).

2.9. Preparación de solución control (RPS14) – compartida con 4014UY.

2.10. Instructivos de uso del destilador y desionizador de agua (INE 109 e INE 121).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

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 fosfomolíbdico, 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 lentes de seguridad.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. 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. El volumen mínimo de muestra a tomar 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 ≤ 6 °C (> 0 °C).

6.3. Si se desea analizar el contenido soluble filtrar la muestra por 0,45µm de tamaño de poro.

6.4. Realizar la determinación antes de las 48 h, de lo contrario, 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 µL

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 µm de diámetro de poro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada según ES 01.

8.2. Solución acuosa de fenoftaleína: Disolver 0,5 g de fenoftaleína ($C_20H_{14}O_4$ Nro. CAS 77-09-8) en 100 mL de agua 8.1. 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 desionizada.

8.4. Reactivo de molibdato de amonio: disolver 20 g de molibdato de amonio [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ Nro. CAS12054-85-2] en 500 mL de agua desionizada. Almacenar en recipiente de vidrio.

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 desionizada. La solución es estable por una semana a ≤ 6 °C (>0 °C),

8.6. Solución stock de fosfato, 50 mg P/L: disolver en agua desionizada 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4Nro. CAS 7778-77-0) anhidro, previamente seco a 105°C durante 1 hora y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.

8.7. Solución de trabajo, 1 mg P/L: A partir de la solución 8.6, realizar una dilución de 50 veces, la toma y el volumen final deben ser realizados por peso con una balanza con resolución 0,01 g. Esta solución es estable por 1 mes. También se puede trabajar con material de referencia certificado, realizando la dilución correspondiente

8.8. Solución control de fosfato, 50 mg P/L: disolver en agua desionizada 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) anhidro, previamente seco a 105°C durante 1 hora y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.

8.9. Solución de tartrato de antimonio y potasio: disolver 1,3715 g de [$K(SbO)C_4H_4O_6.½\ H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2] en 400 mL de agua desionizada en un matraz de 500 mL y llevar al aforo. Almacenar en recipiente de vidrio.

8.10. 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. Homogeneizar después de cada adición. 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.

8.11. HCl 1+1: se prepara diluyendo HCl Nro. CAS 7647-01-0 comercial, al medio con agua 8.1.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material utilizado debe ser de vidrio (incluso el utilizado para almacenar los reactivos).

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. El material se almacena lavado, enjuagado y seco.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. A partir de la solución 8.7, 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 balanza de resolución 0,01 g registrando toma y volumen final, considerando la densidad del agua 1 g/mL.

Volumen de Solución de Trabajo	Volumen final	Concentración en µg 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. Realizar el ajuste de cero del instrumento con una celda de lectura conteniendo agua desionizada.

10.3. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado. A esta medida le llamaremos Abs_{Blanco}.

10.4. 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.

10.5. Agregar 3,2 mL del reactivo combinado. Agitar vigorosamente manteniendo el tubo en posición vertical.

10.6. 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 $Abs_{estándar}$.

10.7. Realizar la gráfica de (Abs. $_{estándar}$ - Abs. $_{Blanco}$) en función de concentración del estándar en µg P/L.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Preparación de los filtros (para el caso de contenido soluble)

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. Pipetear en los tubos o celda de lectura, 20,00mL de la muestra o una alícuota de la misma (filtrada o no según corresponda) diluida a 20,00mL. Realizar la toma con pipetas aforadas ó en peso con precisión 0,01g. Agregar una gota de solución de fenoftaleína. Si la muestra vira a color rosado, agregar H_2SO_4 5N en gotas hasta que vire a incoloro. Tomar en cuenta la dilución que estos agregados genera a la muestra.

11.3. Medir la absorbancia a 880 nm, previo agregado del reactivo combinado. Esta medida corresponde a la Abs_{cero}

11.4. Agregar 3,2mL del reactivo combinado. Agitar vigorosamente manteniendo el tubo en posición vertical.

11.5. 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:

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

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:

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

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:** Preparar el control de la curva de calibración realizando una dilución de un material de referencia certificado o a partir de la solución 8.8. Dicha solución se debe realizar de forma tal que la concentración obtenida resulte aproximadamente en el medio de los estándares de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con las muestras. Obtener el resultado de porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo. Los límites de aceptación serán de 10% hasta contar con el gráfico de control correspondiente según Manual de Calidad Analítico. Si el resultado obtenido se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado una de cada 5 muestras y al menos una por batch. Obtener de la planilla de cálculo el rango normalizado de las muestras analizadas por duplicado. Los límites de aceptación serán de 10% hasta contar con el gráfico de control correspondiente según Manual de Calidad Analítico. Si el resultado obtenido se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Fortificar todas las muestras de aguas residuales y 1 de cada 5 de las muestras de agua natural con 100 µL de la solución 8.8 o una dilución de material de referencia certificado. Los límites de aceptación serán de 20% hasta contar con el gráfico de control correspondiente según Manual de Calidad Analítico. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 4500 P Phosphorus, 4500P-A Introduction, 4500P-B Sample Preparation, 4500P-E Ascorbic Acid Method, pp. 479 - 483 y 486 -487.

14.2. U.S. Environmental Protection Agency. In: Ohrel RL, Register KM, eds. Volunteer Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual, 2nd ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; 2006. Chapter 14: Salinity. EPA-842-B-06-003. pp. 14-1 a 14-8.

4013UY

Determinación de fósforo total en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales

Método espectrofotométrico

Elaborado - P. Simone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Se denomina fósforo total a todo el fósforo presente en una muestra, que corresponden a ortofosfato, fosfatos condensados y fosfatos unidos a materia orgánica.

En el análisis de fósforo total se pueden diferenciar dos procesos, la conversión de las diferentes formas de fósforo de interés en ortofosfato disuelto y la determinación colorimétrica del ortofosfato obtenido.

Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo total en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Es aplicable también en aguas salobres o salinas (salinidad >0,5‰). Mediante este procedimiento se puede determinar fósforo total en un rango lineal de 0,03 a 0,80 mg P/L. El límite de detección es de 0,01 mg P/L. Es posible determinar niveles mayores de fósforo por dilución de la muestra, debiendo determinar previamente el rango de trabajo.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: Determinación de fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales (FIA) (4018 UY).

2.6. Instructivo de uso autoclave (INE 86).

2.7. Instructivos de uso balanzas (INE 16A, INE 16B).

2.8. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 22).

2.9. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.10. Ruta de análisis (RFQ 12).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El fósforo en agua puede encontrarse en combinación con materia orgánica, la determinación del fósforo total implica la oxidación de toda la materia orgánica presente a efectos de asegurarse que todo el fósforo se encuentre finalmente bajo forma de ortofosfato. Luego de la digestión, el fósforo se determina como fósforo reactivo.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. En particular, el persulfato de amonio, y el tartrato de antimonio y potasio son tóxicos por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.

4.4. El ácido sulfúrico está diluido al 30% por lo tanto es corrosivo y debe tratarse con las precauciones del caso.

Nota 1: Al preparar el ácido sulfúrico diluido, verter el mismo sobre el agua destilada y no al contrario, debido a que produce una reacción exotérmica.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso, en concentraciones por encima de 0,1 mg As/L, en aguas naturales no se espera encontrar esos valores.

5.2. Interferencias negativas: el cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 mg/L y entre 10 % y 15 % más bajo a concentraciones de 10 mg/L.

5.3. Na_2S no interfiere con la determinación si se encuentra en concentraciones menores que 1,0 mg/L.

5.4. El ión silicato interfiere si está presente en concentraciones mayores que 10 mg/L. En general la interferencia es insignificante ya que se requeriría una concentración de aprox. 30 mg/L para producir una interferencia positiva de 0,005 mg P/L.

5.5. Concentraciones de hierro mayores a 50 mg/L producen un error negativo por competencia con el complejo por el agente de reducción de ácido ascórbico.

5.6. La contaminación del material de vidrio es un problema en las determinaciones de bajos niveles de fósforo. El material debe lavarse idealmente con HCl diluido caliente y luego con agua desionizada.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 300 mL muestra en frasco de vidrio, o plástico (según la matriz a analizar) lavado sin detergente y enjuagado con HCl 1+1 y posteriormente con agua desionizada.

6.2. Mantener la muestra refrigerada a ≤6 °C (> 0°C).

6.3. En caso de no poder realizar la determinación dentro de las 48horas de obtenida la muestra, se puede preservar la muestra con ácido sulfúrico (H_2SO_4) hasta pH <2, debiendo analizarse antes de los 28 días; o preservada freezada, a temperatura ≤ -10 °C, sin aditivos, durante un máximo de 28 días. Las muestras con bajo contenido de fósforo no deben ser almacenadas en plástico por períodos largos de tiempo a menos que se preserven congeladas.

6.4. Si se desea realizar contenido soluble, filtrar la muestra lo antes posible, preservar freezando a -10ºC, la determinación debe ser realizada dentro de las 48 horas luego del muestreo. (Filtro de membrana de 0.45um de tamaño de poro)

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Autoclave: con posibilidad de desarrollar presiones entre 98 y 137 kPa (1 atm es igual a 101,325 kPa)

7.2. Espectrofotómetro, longitud de onda 880 nm, con paso óptico de 2,5 cm

7.3. Celda: tubos o celdas de lectura de 25 mL de capacidad y 2,5 cm de diámetro

7.4. Balanza de resolución 0,01 g (Uso: preparación de reactivos y tomas de muestra y fortificación)

7.5. Balanza de resolución 0,001 g (Uso: preparación de dilución para curva de calibración y control)

7.6. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 - 10,00 mL y 100 - 1000 µL (para facilitar la toma, aunque se realizan todas las tomas en peso)

7.7. Matraz aforado de 1000 mL y Erlenmeyers de 250 y 500 mL

7.8. Frascos de digestión (Schott o similar), de 100, 250 o 500 mL, según corresponda para la curva y preparación de las muestras a digerir, provistos de tapón plástico que puedan ser autoclavables (resistentes a calor y presión)

7.9. Para el caso de determinación de contenido soluble utilizar filtro de membrana de 0.45 um de tamaño de poro

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES01).

8.2. HCl 1+1: se prepara diluyendo HCl comercial, al medio con agua desionizada.

8.3. 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.

8.4. Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) al 30 %: agregar lentamente 300 mL de H_2SO_4 a 600mL de agua desionizada, y llevar a 1000mL.

8.5. Reactivo sólido de persulfato de amonio ($(NH_4)_2S_2O_8$ Nro. CAS 7727-54-0) o persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$ Nro. CAS 7727-21-1)

8.6. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), 1 N: disolver 20g de NaOH en 500 mL de agua desionizada.

8.7. Ácido sulfúrico (H_2SO_4), 5 N: en 430 mL de agua desionizada verter 70mL de H_2SO_4 conc.

8.8. Reactivo de molibdato de amonio [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ $4H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2]: disolver 20 g de molibdato de amonio en 500 mL de agua 8.1. Almacenar en botellas de vidrio. Solución estable por 6 meses.

8.9. Solución de ácido ascórbico 0,1M: Disolver 1,76 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) en 100 mL de agua desionizada. La solución es estable por una semana a ≤ 6 °C (> 0 °C).

8.10. Solución estándar stock de fosfato, 50mg P/L: Disolver en agua desionizada, 219,5 mg de KH_2PO_4 (Nro. CAS 7778-77-0) anhidro previamente secado a 105 °C y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses. En forma alternativa, emplear material de referencia certificado.

8.11. Solución de trabajo de fosfato, 1mg P/L: Diluir la solución stock 50 veces: 10,00 mL en 500 mL, la toma y el volumen final deben ser realizados por peso con resolución de 0,01 g. Esta solución es estable por 1 mes. Si se utiliza un estándar comercial como solución stock, debe realizarse en la dilución que corresponda de acuerdo a la concentración.

8.12. Solución control de fosfato, 50mg P/L: La misma se prepara de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINACEA.

Alternativamente se puede utilizar un estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado) y realizar las diluciones correspondientes.

8.13. Solución de tartrato de antimonio y potasio: disolver 1,3715 g de $K(SbO)C_4H_4O_6.1/2\ H_2O$ (Nro. CAS 12054-85-2) (o 1,4706 de trihidratado) en 400 mL de agua desionizada en un matraz de 500 mL y llevar al aforo. Solución estable por 6 meses.

8.14. Reactivo combinado: preparar inmediatamente antes del desarrollo de color 100 mL de reactivo combinado, mezclando en el orden dado los siguientes reactivos:

50 mL de H_2SO_4 5 N

5 mL de tartrato de antimonio y potasio

15 mL de molibdato de amonio

30 mL de ácido ascórbico.

Se emplea 3,2 mL de esta solución por cada tubo para el desarrollo de color. Tener en cuenta esto al calcular la cantidad de solución necesaria para toda la corrida.

Importante: Los reactivos deben estar a temperatura ambiente previo al mezclado. Mezclar después de la adición de cada reactivo. Si la solución presenta turbidez agitar y dejar descansar por unos minutos hasta que la turbidez desaparezca. En caso de que la turbidez no desaparezca debe reiterarse la preparación de este reactivo. Este reactivo es estable por 4 horas.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material debe tener un tratamiento de lavado especial, sin detergente. Se realiza el lavado de todo el material con agua caliente, luego un enjuague con ácido clorhídrico 1:1 y finalmente tres enjuagues con agua desionizada.

9.2. Se recomienda realizar la digestión de la muestra antes de las 48horas. La muestra digerida puede conservarse a ≤ 6°C (> 0°C) durante 7 días.

9.3. Tener en cuenta no ajustar demasiado los tapones de los frascos previo a la digestión, debido a que luego será muy difícil su apertura.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Digestión y Neutralización de la curva de calibración

10.1.1. Registrar la masa de los frascos de digestión totalmente secos, y luego hacer tomas por pesada con resolución de 0,01g de la solución de trabajo, según el siguiente esquema. Completar a 80mL con agua desionizada. Realizar las tomas de la solución de trabajo de 1mg P/L como se indica a continuación, completando a 80mL con agua desionizada como volumen final.

Toma de solución de trabajo (g)	Volumen Final previo a la digestión	Concentración final aprox. en 100 mL (µg P/L)
0,0	80	0
1,0	80	10
3,0	80	30
10	80	100
20	80	200
50	80	500
80	80	800

Nota 2: se asume una densidad de 1 g/mL

10.1.2. Adicionar 1 gota de indicador de fenoltaleína. Si se desarrolla un color rojizo, adicionar H_2SO_4. hasta que el color desaparezca. Luego adicionar 1 mL de solución de H_2SO_4.

10.1.3. A cada frasco agregar 0,4 g de reactivo de persulfato de amonio o 0,5 g de persulfato de potasio y 1 mL de ácido sulfúrico al 30 %.

10.1.4. Digerir la muestra en autoclave durante 30 minutos a una presión entre 98 y 137 kPa y 121°C.

10.1.5. Dejar alcanzar la temperatura ambiente.

10.1.6. El desarrollo de color se puede realizar a continuación o pueden guardarse los frascos conteniendo el material digerido en heladera ≤ 6 °C (> 0 °C) durante 7 días. Esa es la fecha de vencimiento para realizar el desarrollo de color.

10.1.7. Previo al desarrollo de color: Agregar una gota de reactivo acuoso de fenoftaleína a cada frasco de digestión. Neutralizar con la solución NaOH 1 N hasta viraje a color levemente rosado, (la neutralización insume aproximadamente 10 mL)

10.1.8. Luego de la neutralización, llevar con agua desionizada hasta 100 mL registrar el peso final.

10.2. **Desarrollo de Color- opción A**

10.2.1. Realizar tomas en peso de cada frasco de digestión, de 20 mL con resolución de 0,01 g en los tubos o celdas de lectura.

10.2.2. Realizar el ajuste de cero del instrumento con un tubo o celda de lectura con agua desionizada.

10.2.3. Medir la absorbancia de cada solución antes de agregar el reactivo combinado a esta medida se le llamará Abs_{Blanco}.

10.2.4. Agregar agitando vigorosamente a cada tubo 3.2 mL del reactivo combinado.

10.2.5. Medir la absorbancia de las soluciones a 880 nm de longitud de onda, entre 10 y 30 minutos luego de agregado el reactivo combinado.

10.2.6. Realizar la gráfica de ($Abs_{estándar}$ - Abs_{Blanco}) en función de concentración del estándar en µg P/L.

10.3. **Desarrollo de Color- opción B**

Realizar la determinación utilizando la metodología 4018UY Determinación de fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales (FIA)

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Digestión y Neutralización de las muestras.

Proceder como lo indica el punto 10.1, realizando tomas por peso de 80 mL de muestra o la dilución que corresponda, con resolución 0,01 g.

11.2. Desarrollo de Color

Proceder como se indica en 10.2 o 10.3.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La concentración de fósforo de los estándares de la curva de calibración se calcula según:

$$\mu g\ P/L = Pt / (Pf - PF) \times d$$

donde:

µg P/L: corresponde a la concentración de fósforo en el estándar

Pt: corresponde a la toma en peso de la solución de trabajo (g)

Pf: corresponde al peso final (Frasco + Toma + Reactivos + Agua luego de la neutralización).

PF: corresponde al peso del frasco de digestión (g)

d: corresponde a densidad del agua a temperatura ambiente (considerar 1 g/mL).

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

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

donde:

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

La concentración de fosfato en la muestra se calcula según:

$$\text{Fósforo total, } \mu g\ P/L = \frac{(Abs\ muestra - Abs\ cero - b) \times FD_1 \times FD_2}{a}$$

donde:

FD_1: (factor de dilución de la muestra) = volumen final en frasco / toma de la muestra

FD_2: Volumen final en la celda de lectura/ toma de la muestra a partir del digesto

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

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración realizando una dilución de un material de referencia certificado o a partir de la solución 8.12. Dicha solución se debe realizar de forma tal que la concentración obtenida resulte aproximadamente en el medio de los estándares de la curva de calibración. Analizar esta solución simultáneamente con las muestras. Obtener el resultado de porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo. Los límites de aceptación serán de 10% hasta contar con el gráfico de control correspondiente según Manual de Calidad Analítico. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de una cada 5 muestras y al menos una por batch. Obtener de la planilla de cálculo el rango normalizado de las muestras analizadas por duplicado. Los límites de aceptación serán de 10% hasta contar con el gráfico de control correspondiente según Manual de Calidad Analítico. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Fortificar todas las muestras de aguas residuales y 1 de cada 5 de las muestras de agua natural con la solución 8.12 o una dilución del material de referencia certificado. Los límites de aceptación serán de 20% hasta contar con el gráfico de control correspondiente según Manual de Control de Calidad Analítico. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 4500 P Phosphorus, 4500P-A Introduction, 4500P-B Sample Preparation, 4500P-E Ascorbic Acid Method, pp. 479 - 483 y 486 -487.

14.2. U.S. Environmental Protection Agency. In: Ohrel RL, Register KM, eds. Volunteer Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual, 2nd ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; 2006. Chapter 14: Salinity. EPA-842-B-06-003. pp. 14-1 a 14-8.

4014UY

Determinación de Fósforo Total en aguas y efluentes

Flow Injection Analysis (FIA)

Elaborado - E. Broggi

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Se denomina fósforo total a todo el fósforo presente en una muestra, que corresponde a ortofosfato, fosfatos condensados y fosfatos unidos a materia orgánica.

Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo total en aguas naturales, salobres o salinas, y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango de trabajo es de (0,046 – 50) mg P/L y el rango lineal (0,046 – 10) mg P/L. El límite de detección es de 15 µg P/L

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA .

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 78).

2.6. Instructivo de uso de balanzas de plato abierto (INE 16A, INE 16B).

2.7. Instructivo de uso de balanza analítica (INE115).

2.8. Instructivo de uso del destilador y desionizador de agua (INE109, INE121).

2.9. Ruta de análisis (RFQ 27).

2.10. Ruta de preparación de solución control (RPS14).

2.11. Ruta de preparación de reactivos (RPR17).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizadas en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método se basa en la digestión de varias formas de fósforo a ortofosfato mediante peroxodisulfato con digestión UV en línea. El fósforo orgánico es transformado a ortofosfato por la digestión con persulfato catalizada mediante luz UV. Los polifosfatos son transformados a ortofosfato por digestión con ácido sulfúrico también en línea. El proceso de digestión se lleva a cabo previo a la válvula de muestra del equipo. Una porción de la muestra digerida es luego inyectada y los fosfatos determinados mediante FIA.

El ión ortofosfato (PO_4^{3-}) reacciona con molidbato de amonio y tartrato de antimonio y potasio en medio ácido para formar un complejo. Este complejo es reducido con ácido ascórbico para formar un complejo de color azul que absorbe a 880 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de ortofosfato en la muestra en el rango lineal de la técnica.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere empleo de túnica y guantes.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. En particular el persulfato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio son tóxicos por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.

4.4. El ácido sulfúrico es corrosivo y debe tratarse con las precauciones del caso.

Nota 1: Al preparar el ácido sulfúrico diluido, verter el mismo sobre el agua destilada y no en orden contrario debido a que produce una reacción exotérmica.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso, en concentraciones por encima de 0,1 mg As/L; en aguas naturales no se espera encontrar esos valores.

5.2. Interferencias negativas: el cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 mg/L y entre 10 % y 15 % más bajo a concentraciones de 10 mg/L.

5.3. Na_2S no interfiere con la determinación si se encuentra en concentraciones menores que 1,0 mg/L

5.4. El ión silicato interfiere si está presente en concentraciones mayores que 10 mg/L. En general la interferencia es insignificante ya que se requeriría una concentración de aprox. 30 mg/L para producir una interferencia positiva de 0,005 mg P/L.

5.5. Concentraciones de hierro mayores a 50 mg/L producen un error negativo por competencia con el complejo por el agente de reducción de ácido ascórbico.

5.6. La contaminación del material de vidrio es un problema en las determinaciones de bajos niveles de fósforo. El material debe lavarse idealmente con HCl diluido caliente y luego con agua desionizada.

5.7. Es recomendable desgasificar los reactivos que se utilizan en el sistema de inyección en flujo para prevenir ingreso de burbujas en el sistema.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 100 mL muestra en frasco de vidrio, o plástico (según la matriz a analizar) lavado sin detergente y enjuagado con HCl 1+1 y posteriormente con agua desionizada.

6.2. Mantener la muestra refrigerada a ≤6 °C (> 0°C).

6.3. En caso de no poder realizar la determinación dentro de las 48 hs de extraída la muestra, se puede preservar la misma con ácido sulfúrico (H_2SO_4) hasta pH <2, refrigerando a temperatura entre 0 y 6 °C, debiendo analizarse antes de los 28 días. En forma alternativa freezar a temperatura ≤ -10 °C, sin aditivos, durante un máximo de 28 días. Las muestras con bajo contenido de fósforo no deben ser almacenadas en plástico por períodos largos de tiempo a menos que se preserven congeladas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold y digestor para la determinación de fósforo total (LACHAT QuickChem 8500 o similar).

7.2. Balanza de resolución 0,001 g (Uso: preparación de curva de calibración, diluciones de soluciones control, estándar, muestras y fortificaciones).

7.3. Balanza de resolución de 0,01 g (Uso: preparación de reactivos del equipo).

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 – 10,00 mL y 100 – 1000 µL. (para facilitar la toma, aunque se realizan todas las tomas en peso).

7.5. Frascos o matraces Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL (Uso: diluciones necesarias de muestras y preparación de reactivos del equipo).

7.6. Para el caso de determinación de contenido soluble utilizar filtro de membrana de 0.45 um de tamaño de poro.

Nota 2: todo el material que se utilice debe lavarse sin detergente, enjuagarse con ácido clorhídrico diluido (HCl 1+1) y posteriormente enjuagar con agua desionizada.

8. REACTIVOS

8.1. **Solución de molibdato de amonio:** pesar 20,0 g de molibdato de amonio tetrahidratado [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\,4H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2) y verter en un matraz aforado de 500 mL pesar. Agregar agua desionizada y disolver con agitador magnético durante al menos 4 horas. Llevar hasta aforo con agua desionizada. Almacenar en plástico y refrigerar. La solución es estable por 4 meses.

8.2. **Solución de tartrato de antimonio y potasio:** pesar 1,61 g de tartrato de antimonio y potasio trihidratado ó 1,50 g del reactivo hemihidratado [$K(SbO)C_4H_4O_6.3\,H_2O$ Nro. CAS 28300-74-5] y verter en un matraz aforado de 500 mL. Agregar agua desionizada y disolver con agitador magnético. Llevar hasta aforo con agua desionizada. Almacenar en plástico oscuro y refrigerar. La solución es estable por 4 meses.

8.3. **Reactivo combinado de color:** pesar en un recipiente adecuado 178,75 g de agua desionizada, agregar 53,25 g de la solución de molibdato de amonio y 18 g de la solución de tartrato de antimonio y potasio. Luego añadir 5,7 g de hidróxido de sodio (NaOH(s) Nro. CAS 1310-73-2). Agitar y disolver (desgasificar si es necesario). Preparar semanalmente.

8.4. **Solución de reducción de ácido ascórbico:** pesar en un recipiente adecuado 14 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) y agregar 195 g de agua desionizada. Mezclar con agitador magnético hasta disolver (desgasificar si es necesario). Añadir 0,2 g de dodecil sulfato de sodio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$ Nro. CAS 151-21-3). Mezclar con agitador magnético. La solución es estable durante 2 días.

8.5. **Solución carrier de ácido sulfúrico:** en un recipiente adecuado pesar 240,5 g de agua desionizada, agregar lentamente 17,5 g de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9). Enfriar la solución (desgasificar si es necesario) y agregar 1,25 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5). Luego añadir 0,20 g de dodecil sulfato de sodio. Invertir para mezclar.

8.6. **Reactivo de digestión 1:** en un recipiente adecuado agregar 223,4 g de agua desionizada y luego, lentamente, 49,0 g de ácido sulfúrico concentrado. (CUIDADO: esta solución se torna muy caliente). Desgasificar si es necesario antes de utilizar. Preparar semanalmente.

8.7. **Reactivo de digestión 2:** en un recipiente adecuado agregar 250 g de agua desionizada y luego 6,5 g de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$ Nro. CAS 7727-21-1). Mezclar con agitador magnético hasta disolver. Preparar semanalmente y desgasear si es necesario antes de utilizar.

8.8. **Solución estándar stock de fosfato, 1000 mg P/L:** usar estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado).

Alternativamente disolver en agua destilada 1,097 g de fosfato de potasio monobásico anhidro previamente secado a 105 °C (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) y llevar a 250 mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.

8.9. **Solución control de fosfato, 50 mg P/L.** La misma se prepara de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINACEA.

8.10. **Soluciones control de digestión, 1000 mg P/L.** (Fenil fosfato $C_6H_5Na_2O_4P.2H_2O$ Nro. CAS 66778-08-3, Trimetil fosfato $C_3H_9O_4P$ Nro. CAS 512-56-1, Pirofosfato de sodio $Na_4P_2O_7.10H_2O$ Nro. CAS 13472-36-1, Tripolifosfato de sodio $Na_5P_3O_{10}$ Nro. CAS 7758-29-4). Las mismas se preparan de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINACEA.

8.11. **Agua desionizada** (según ES 01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. La muestra debe estar homogeneizada y a temperatura ambiente para realizar el análisis.

9.2. Todo el material utilizado debe tener un tratamiento de lavado especial, sin detergente. Se realiza el lavado de todo el material con agua caliente, luego un enjuague con ácido clorhídrico 1:1 y finalmente tres enjuagues con agua destilada.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparación de la curva de calibración a partir de la solución 8.8 que cubra el rango lineal de la técnica, (sugerencia de tomas posibles):

Conc. Std. (mg PO4 - P/L)	masa sol. estándar (g)	masa fin (g)	Conc. aprox. fin (mg PO4 - P/L)
1000	0.5	50	10
1000	0.25	50	5
10	5	50	1
10	2,5	50	0,5
10	1,25	50	0,25
10	0,5	50	0,10
10	0,25	50	0,050

Emplear la primera dilución preparada para generar las 5 soluciones correspondientes a los 5 últimos puntos de la curva.

10.2. Preparar una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de la solución 8.9, de acuerdo a la siguiente posible dilución:

Conc. Std. (mg PO_4 - P/L)	masa sol. control (g)	masa fin (g)	Conc. aprox. fin (mg PO_4 - P/L)
50	0,50	50	0,50

Nota 3: se asume una densidad de 1 g/mL para todas las diluciones.

10.3. En caso de analizar únicamente aguas naturales, puede utilizarse el rango de (0,046 – 1) mg PO_4 -P/L. Para efluentes es recomendable trabajar en el rango de (0,046 – 10) mg PO_4 -P/L. En cualquiera de los dos rangos trabajar con 4 estándares para la construcción de la curva de calibración como mínimo.

10.4. Preparación de las soluciones control de digestión, de acuerdo al Manual de Control de Calidad Analítico, para el chequeo de la digestión realizada en línea por el equipo FIA. Se requiere soluciones de concentración aproximada de 1mg PO_4 – P/L; realizar las diluciones según indica el cuadro como ejemplo a partir de las soluciones 8.10:

Conc. Control de digestión (mg PO_4 - P/L)	masa control de digestión: (g)	masa fin del control de digestión: (g)	Conc. aprox. final (mg PO_4 - P/L)
1000	0,050	50	1

10.5. Encender el equipo de inyección en flujo y el digestor.

10.6. Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

10.7. Colocar cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar a la temperatura de trabajo (125 °C) por unos 15 minutos. Nunca trabajar con el digestor por encima de 70 °C sin hacer pasar líquido a través del mismo.

10.8. Colocar los estándares de la curva de calibración, el control de curva y los controles de digestión en los tubos del rack del autosampler en el orden apropiado. Se recomienda comenzar con el blanco de agua desionizada y luego los estándares de menor a mayor concentración.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Colocar una porción de cada muestra a analizar en los tubos del rack del autosampler (enjuagar previamente cada tubo con la muestra a ser contenida en el mismo)

11.2. Las muestras de aguas naturales se analizan en forma directa (sin dilución).

11.3. Para efluentes se realiza una dilución mínima de 10 veces (recomendación del equipo), y máxima de 50 veces (dado por el rango de trabajo). Realizar los registros en la ruta RFQ27.

11.4. Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar.

11.5. No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo.

11.6. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (Área vs Concentración) y calcula la concentración de los controles y las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no ha habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Eventualmente se pueden seleccionar los estándares que efectivamente se desea que conformen curva de calibración. Aunque el programa utilizado construye automáticamente la curva de calibración, se debe verificar que la misma tenga un coeficiente de correlación que cumpla con el criterio de aceptación establecido en el Manual de Control de Calidad Analítica, y que la curva con los puntos seleccionados cubran el rango de concentración de las muestras analizadas. Si es necesario, volver a integrar todos los picos de la corrida con la nueva curva de calibración.

12.4. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.

12.5. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Analizar el control de la curva de calibración preparado en el punto 10.2, luego de la curva de calibración. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes. Se aceptará una desviación de ± 10 % del valor calculado de concentración del estándar, hasta tener el grafico de control de exactitud para este método. Si el resultado del control está por fuera del criterio establecido revisar el procedimiento según lo indica el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la exactitud continuo:** Analizar el control de exactitud preparado según punto 10.2, cada 5 muestras de efluentes ó 10 muestras de aguas, y al final de toda la secuencia. Se aceptará una desviación de ± 10 % del valor calculado de concentración del estándar.

13.3. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada 5 muestras de aguas y uno cada 3 muestras de efluentes, o al menos uno por serie de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado. Los límites de aceptación serán de un 10 % para matrices liquidas, hasta contar con el gráfico de control correspondiente, según la matriz analizada. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.4. **Porcentaje de recuperación:** En un recipiente adecuado pesar 50 g de la muestra a ser analizada y fortificar con 250 µL, de la solución control de 50 mg PO_4/L.

Si los efluentes fueron diluidos se debe fortificar la dilución y no la muestra original. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas, aceptando una recuperación entre el 80% y 120% para todas las matrices. Si algún resultado se encuentra fuera de control, revisar el procedimiento y si corresponde repetir el análisis según lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.5. **Control de digestión:** Analizar rutinariamente las 4 diferentes soluciones de digestión preparadas en 10.4, Para dichos controles se aceptarán recuperaciones superiores al 90 %, hasta contar con gráficos de control para cada uno de ellos propios del equipo. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite establecido, revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

13.6. **Control de blancos:** Realizar una inyección de un blanco de agua desionizada después de la curva de calibración y cada 5 muestras de efluentes y/o aguas. La concentración de esta muestra blanco debe ser menor al límite de cuantificación, de forma de verificar que el equipo no arrastra contaminación. Cuando el resultado no cumpla este criterio, revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. LACHAT METHOD MANUAL, QuikChem® Method 10-115-01-3-A, Determination of total phosphorus by FIA colorimetry with on-line digestion. (basado en EPA-600/R-93-100, Revised March 1993, Method 365.1).

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 4500-P A. Introduction y 4500-P I In line UV/persulfate digestion and flow injection analysis for total phosphorus pp. 479 a 482 y 491 a 493.

4017UY

Determinación de fósforo total en matrices sólidas

Digestión de la muestra y análisis por método FIAS
(Flow Injection Analysis System)

Elaborado - S. Malacre

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de fósforo total en matrices sólidas incluyendo suelos, sedimentos y residuos para uso como mejorador de suelo.

El intercambio de fósforo entre sedimentos y la columna de agua es el mayor componente del ciclo de fósforo en cuerpos de aguas naturales.

Son de importancia en el intercambio factores físicos, químicos y metabólicos. Los factores más importantes son:

1. Capacidad de los sedimentos para retener fósforo.

2. Condiciones particulares de la columna de agua.

3. Biota de los sedimentos.

Estos factores alteran el equilibrio de intercambio y el transporte de fósforo de vuelta a los sedimentos.

Mediante este procedimiento se puede determinar Fósforo total, en un rango de trabajo de 11,5 - 25000 mgP/Kg.

El límite de detección es de 3,8 mgP/Kg.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de la Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Procedimiento analítico para determinación de fósforo total en aguas y efluentes (4014UY)

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 115, INE 16A e INE 16B)

2.7. Instructivo de uso desionizador de agua (INE 121)

2.8. Instructivo de uso del equipo de Flow Injection Analysis - FIA (INE 78)

2.9. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 01, INE 02)

2.10. Instructivo de uso estufa (INE 101, INE 107)

2.11. Instructivo de uso plancha calefactora con agitación (INE 129)

2.12. Instructivo de uso baño de agua con ultrasonido (INE 69, INE 108, INE 134)

2.13. Ruta de análisis (RFQ 40)

2.14. Ruta de preparación de reactivos (RPR 17)

2.15. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La forma más común de encontrar el fósforo en el ambiente, es bajo su estado de oxidación +5 (fosfato o compuestos derivados) para poder obtener fracciones orgánicas ligadas, o sales dependiendo de su contra-ion. El método se basa en la digestión con ácido sulfúrico y nitrato de potasio en caliente.

El proceso de digestión se lleva a cabo previo a la determinación instrumental. Una porción de la muestra digerida es luego inyectada y los fosfatos determinados mediante FIA.

El ion ortofosfato (PO_4^{3-}) reacciona con molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio en medio ácido para formar un complejo. Este complejo es reducido con ácido ascórbico para formar un complejo de color azul que absorbe a 880 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de ortofosfato en la muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere el equipo de seguridad apropiado (túnica, guantes, lentes y mascarilla protectora adecuada).

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. En particular el persulfato de amonio, el tartrato de antimonio y potasio y el nitrato de potasio son tóxicos, por lo que se aconseja leer la hoja que acompaña las especificaciones de dichos reactivos.

4.4. El ácido sulfúrico es muy corrosivo y debe tratarse con las precauciones del caso.

4.5. Realizar extracción de fósforo bajo campana extractora.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interferencia positiva: el arseniato reacciona con el reactivo de molibdeno produciendo color azul intenso, en concentraciones por encima de 0,1 mg As/L.

5.2. Interferencias negativas: el Cromo hexavalente y los nitritos interfieren dando resultados 3 % más bajo a concentraciones de 1 mg/L y entre 10 % y 15 % más bajo a concentraciones de 10 mg/L.

5.3. Na_2S no interfiere con la determinación si se encuentra en concentraciones menores que 1,0 mg/L.

5.4. El ion silicato interfiere si está presente en concentraciones mayores que 10 mg/L. En general la interferencia es insignificante ya que se requeriría una concentración de aprox. 30 mg/L para producir una interferencia positiva de 0,005 mg P/L.

5.5. Concentraciones de hierro mayores a 50 mg/L producen un error negativo por competencia con el complejo por el agente de reducción de ácido ascórbico.

5.6. La contaminación del material de vidrio es un problema en las determinaciones de bajos niveles de fósforo. El material debe lavarse idealmente con HCl diluido caliente y luego con agua desionizada. Dados los altos niveles de fósforo presente en las muestras analizadas (matrices sólidas), esto no resulta como interferencia.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se recoge 200 g de la muestra en bolsa de polietileno con cierre hermético e impermeable. Se debe mantener bajo condiciones de refrigeración (entre 0 y 6°C).

6.2. El tiempo máximo para realizar la determinación luego del muestreo es de 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,001 g

7.2. Balanza analítica de resolución 0,1 mg

7.3. Balanza de resolución de 0,01 g.

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 – 10,00)mL

7.5. Matraces de 250mL.

7.6. Frascos Schott o matraces Erlenmeyer de 250mL y 500mL

7.7. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de solución de 250mL

7.8. Bomba de vacío

7.9. Filtros Nro. 40 Whatman (82 g/m^2) o equivalente adecuado a portafiltro

7.10. Mortero de porcelana

7.11. Tamiz (tamaño de poro ≤ 2 mm)

7.12. Estufa de secado

7.13. Plancha calefactora

7.14. Espátula

7.15. Placa de Petri para secado de muestra.

7.16. Desecador con sílica gel con indicador de color

7.17. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de manifold y digestor para la determinación de fósforo total (LACHAT QuickChem 8500 o similar)

7.18. Campana de extracción para el empleo en la realización de la extracción.

8. REACTIVOS

8.1. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9).

8.2. Nitrato de potasio 99 % (KNO_3 Nro. CAS 7757-79-1).

8.3. Agua desionizada (según ES 01).

8.4. Solución de molibdato de amonio: pesar 20,0g de molibdato de amonio tetrahidratado [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ Nro. CAS 12054-85-2] y verter en un matraz y llevar a de 500mL con agua desionizada. Disolver con agitador magnético durante al menos 4 horas. Almacenar en plástico y refrigerar. La solución es estable por 4 meses. Dejar registro en RPR 17.

8.5. Solución de tartrato de antimonio y potasio: pesar 1,61g de tartrato de antimonio y potasio trihidratado [$K(SbO)C_4H_4O_6.3H_2O$ Nro. CAS 28300-74-5] ó 1,50g del reactivo hemihidratado y verter en un matraz. Llevar a 500mL con agua desionizada. Disolver con agitador magnético. Almacenar en plástico oscuro y refrigerar. La solución es estable por 4 meses. Dejar registro en RPR 17.

8.6. Reactivo combinado de color: pesar en un recipiente adecuado 178,75g de agua desionizada, agregar 53,25g de la solución de molibdato de amonio y 18 g de la solución de tartrato de antimonio y potasio. Luego añadir 5,7g de hidróxido de sodio (NaOH(s) Nro. CAS 1310-73-2). Agitar y disolver (desgasear en caso de ser necesario). Preparar semanalmente.

8.7. Solución de reducción de ácido ascórbico: pesar en un recipiente adecuado 14 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) y agregar 195g de agua desionizada. Mezclar con agitador magnético hasta disolver (desgasear si es necesario). Añadir 0,2 g de dodecil sulfato de sodio ($NaC_{12}H_{25}SO_4$ Nro. CAS 151-21-3). Mezclar con agitador magnético. La solución es estable durante 2 días.

8.8. Solución carrier de ácido sulfúrico: en un recipiente adecuado pesar 240,5g de agua desionizada, agregar lentamente 17,5g de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Enfriar la solución (desgasear si es necesario) y agregar 1,25g de cloruro de sodio (NaCl). Luego añadir 0,20g de dodecil sulfato de sodio. Invertir para mezclar.

8.9. Reactivo de digestión 1: en un recipiente adecuado agregar 223,4g de agua desionizada y luego, lentamente, 49,0g de ácido sulfúrico concentrado. (CUIDADO: esta solución se torna muy caliente). Desgasear si es necesario antes de utilizar. Preparar semanalmente.

8.10. Reactivo de digestión 2: en un recipiente adecuado agregar 250 g de agua desionizada y luego 6,5g de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$ Nro. CAS 7727-21-1). Mezclar con agitador magnético hasta disolver. Preparar semanalmente y desgasear si es necesario antes de utilizar.

8.11. Solución control de fosfato, 50 mg P/L. La misma se prepara de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINACEA.

8.12. Soluciones control de digestión, 1000 mg P/L. (Fenil fosfato, Trimetil fosfato, Pirofosfato, Tripolifosfato). Las mismas se preparan de acuerdo a lo establecido en el Manual de Control de Calidad Analítico del laboratorio de la DINACEA.

8.13. Solución estándar de fosfato para curva de calibración: usar estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado). En caso de no disponer de dicha solución comercial, disolver en agua destilada 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro previamente secado a 105 °C (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) y llevar a 1000mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.

8.14. Solución estándar de fosfato para fortificaciones: usar estándar comercial de alrededor de 1000 mg/L de concentración (con valor certificado). En caso de no disponer de dicha solución comercial, disolver en agua destilada 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro previamente secado a 105 °C (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) y llevar a 1000mL en matraz aforado. Esta solución es estable por 6 meses.

Nota 1: Es recomendable desgasear los reactivos que se utilizan en el sistema de inyección en flujo (excepto los estándares y controles) para prevenir formación de burbujas en el sistema.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. La muestra debe estar homogeneizada y a temperatura ambiente para realizar el análisis.

9.2. Todo el material que se utilice debe lavarse sin detergente.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de estándares a partir de la solución de alrededor de 1000 mg/L, referencia en el ítem 8.13, de acuerdo al siguiente cuadro:

Conc. Std. (mg PO_4 - P/L)	Masa sol. estándar (g)	Masa fin (g)	Conc. aprox. fin (mg PO_4 - P/L)
1000	0,5	50	10
1000	0,25	50	5
10	5	50	1
10	2,5	50	0,50
10	1,25	50	0,25
10	0,50	50	0,10
10	0,25	50	0,050

Nota 2: En caso de partir de otra concentración, realizar los cálculos correspondientes.

10.2. Preparar una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de la solución 8.11, de acuerdo a la siguiente dilución:

Conc. Std. (mg PO_4 - P/L)	Masa sol. control (g)	Masa fin (g)	Conc. aprox. fin (mg PO_4 - P/L)
50	0,50	50	0,50

Nota 3: Se asume una densidad de 1 g/mL para todas las diluciones.

10.3. Preparación de las soluciones control de digestión, para el chequeo de la digestión realizada en línea por el equipo FIA, se requieren soluciones de concentración aproxima de 1mg PO_4 – P/L; realizar las diluciones según indica el cuadro como ejemplo a partir de las soluciones 8.12:

Conc. Control de digestion: (mg PO_4 - P/L)	masa control de digestión: (g)	masa fin del control de digestión: (g)	Conc. aprox. Final (mg PO_4 - P/L)
50	0,50	50	0,50

10.4. Encender el equipo de inyección en flujo y el digestor.

10.5. Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

10.6. Colocar cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar a la temperatura de trabajo (125 °C) por unos 15 minutos.

Nota 5: Nunca trabajar con el digestor a temperatura mayor que 70 °C sin hacer pasar líquido a través del mismo.

10.7. Colocar los estándares de la curva de calibración y el control en los tubos del rack del autosampler en el orden apropiado. Se recomienda comenzar con el blanco de agua desionizada y luego del estándar de menor a mayor concentración.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. **Preparación de la muestra (digestión):** Secar la muestra en estufa a 38 °C ± 2 °C, durante al menos 24 h. Morterear la muestra secada y tamizar para tener un tamaño de partícula ≤2mm de diámetro. Pesar en balanza analítica (con resolución de 0,1 g) 0,7 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250mL.

11.2. Agregar en campana, 20mL de H_2SO_4 concentrado, calentar lentamente hasta ebullición. Una vez alcanzada la misma, dejar en la plancha 5 min. Retirar de la plancha y esperar a que se enfríe.

11.3. Agregar 10 g de KNO_3 y calentar esta mezcla a ebullición hasta desaparición de humos color naranja. En caso de que esto no ocurra, agregar de a 1 g de KNO_3, hasta lograr dicha desaparición de humos.

11.4. La reacción queda completa cuando no se obtiene más humo coloreado y la solución resultante se torna translúcida.

11.5. Una vez obtenida la solución translúcida, retirar de la plancha y dejar enfriar.

11.6. Agregar aproximadamente 150mL de agua desionizada.

11.7. Seguidamente filtrar a través de papel de filtro Whatman Nro. 40 (82 g/m^2) o equivalente.

11.8. Llevar a 250mL con agua desionizada, habiendo pesado y registrado previamente la masa de los matraces vacíos.

11.9. Pesar los matraces con la solución obtenida. Registrar.

11.10. Determinar la densidad de la muestra. Registrar.

11.11. Simultáneamente realizar un blanco de reactivos.

11.12. **Análisis de la muestra (medida):** Colocar una porción de cada muestra a analizar en los tubos del rack del autosampler. Si fuera necesario, es posible realizar una dilución de hasta aproximadamente 10 veces. Registrar la masa de la muestra y la masa final de la dilución.

11.13. Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, controles y muestras.

11.14. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración Área en función de la concentración y calcula la concentración de los controles y las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no ha habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Eventualmente se pueden seleccionar los estándares que efectivamente se desea que conformen la curva de calibración y recalcular las concentraciones (esto es efectuado automáticamente por el programa)

12.4. Generar el reporte de la secuencia en el programa y guardarlo en la carpeta correspondiente.

12.5. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo al punto 10.2. Analizar el control en la secuencia luego de la curva de calibración, cada 5 muestras, y al final de toda la secuencia. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes. Si el resultado del control de la curva está fuera de control revisar el procedimiento, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico y si corresponde repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

13.2. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado a todas las muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control estadístico en el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación y control de digestión en plancha:** Realizar cada 3 muestras una fortificación, agregando 300 µL de solución estándar de fosfato (8.14) a la toma de muestra realizada para la digestión. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos se encuentren bajo control estadístico en el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, revisar el procedimiento, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico y si corresponde repetir el análisis.

13.4. **Control de digestión en equipo:** Preparar rutinariamente soluciones de digestión de 1 mg P/L como en 10.3, mediante dilución de los controles de digestión preparados de acuerdo al Manual de Control de Calidad. Para dichos controles se aceptarán recuperaciones superiores al 90 %. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite establecido, revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

13.5. **Control de Blancos:** Realizar la extracción en conjunto con las muestras a un blanco de agua desionizada. Realizar una inyección de un blanco de agua desionizada después de la curva de calibración y cada cinco muestras. La concentración de esta muestra blanco debe ser menor al límite de cuantificación, de forma de verificar que el equipo no arrastra contaminación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del límite establecido, revisar el procedimiento y de ser necesario repetir el análisis de todas las muestras de esa serie.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. LACHAT METHOD MANUAL, QuikChem® Method 10-115-01-3-A, Determination of total phosphorus by FIA colorimetry with on-line digestion. (basado en EPA-600/R-93-100, Revised March 1993, Method 365.1).

14.2. AOAC (1965) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 10th Edition Method 2.017 (d), Determination total Phosphorus.

4018UY

Determinación de Fósforo reactivo (PO4) suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales

Flow Injection Analysis (FIA)

Elaborado - N. Bado

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de ortofosfato (PO_4^{3-}) suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales. Es aplicable también a aguas salobres o salinas (salinidad >0,5‰). 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 su determinación. El rango lineal de trabajo es de (0,022 –30,00) mg P/L. El límite de detección es de 0,0074 mg P/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 78).

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 16A, INE 16B, INE 15, INE 115).

2.7. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02, INE 01).

2.8. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.9. Ruta de análisis (RFQ 49).

2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método se basa en la reacción del ion ortofosfato (PO_4^{3-}) con el molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio bajo condiciones ácidas para formar un complejo. Este complejo se reduce con ácido ascórbico para formar un complejo azul que absorbe la luz a una longitud de onda de 880 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de ortofosfato en la muestra y es determinada con un equipo de inyección en flujo (FIA).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

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. Una de las interferencias posibles del método son las partículas grandes o fibrosas, para prevenirlo, la muestra debe ser filtrada a través de fibra de vidrio.

5.2. La sílice forma un complejo azul que también absorbe a 880 nm, aunque generalmente es despreciable debido a que una concentración de 30mg/L de sílice produce un error positivo de tan solo 0,005mg P/L.

5.3. Concentraciones de hierro mayores a los 50mg/L causan un error negativo ya que compiten con el complejo por el ácido ascórbico el cual actúa como agente reductor. Para evitar que esto ocurra, las muestras con alto contenido en hierro deben ser tratadas con bisulfito de sodio. El bisulfito de sodio también sirve para eliminar la interferencia debida a los arseniatos.

5.4. Para las determinaciones de bajas concentraciones de fósforo, la contaminación en el material de vidrio utilizado puede ser un problema. Por lo tanto, para evitar dicha contaminación, el material de vidrio debe ser lavado con ácido clorhídrico diluido en caliente y enjuagado con agua destilada. Si por algún motivo se debe utilizar detergente, el mismo debe ser libre de fosfato.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La cantidad de muestra mínima a recolectar es de 100mL y se debe recolectar en frasco de vidrio, lavado sin detergente, enjuagado previamente con ácido clorhídrico (HCl) 1+1.

6.2. Si se desea determinar fosfato disuelto se debe filtrar la muestra inmediatamente y almacenar a una temperatura ≤6ºC. En todos los casos se debe realizar la determinación antes de las 48 hs, de lo contrario, 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. Balanza de resolución 0,001 g.

7.2. Balanza de resolución de 0,01 g.

7.3. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 - 10,00) mL y (10 – 100) µL.

7.4. Matraces aforados de 100, 200 y 1000 mL.

7.5. Matraces Erlenmeyer de 150 ó 250 mL.

7.6. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de manifold para la determinación de ortofosfato (LACHAT QuickChem 8500 o similar)

7.7. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco succión de 250mL o 1000mL.

7.8. Bomba de vacío.

7.9. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45µm de tamaño de poro.

8. REACTIVOS

8.1. **Solución stock de molibdato de amonio:** en un recipiente de 1L agregar 40,0g de molibdato de amonio tetra-hidratado [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$] y 983 g de agua (8.7). Mezclar con agitador magnético por al menos 4 hs. Almacenar en un recipiente de plástico en heladera. La solución es estable por 4 meses.

8.2. **Solución stock de tartrato de antimonio y potasio:** en un recipiente oscuro de 1L añadir 3,0 g de tartrato de antimonio y potasio hemi-hidratado [$K(SbO)C_4H_4O_6.1/2H_2O$] y 995 g de agua (8.7). Mezclar con agitador magnético hasta disolución. Almacenar en recipiente oscuro en heladera. Esta solución es estable por hasta 2 meses.

8.3. **Reactivo color:** en un recipiente de 1L añadir 680g de agua (8.7) y añadir 64,4g de ácido sulfúrico concentrado (tener en cuenta que esta solución se puede volver muy caliente). Mezclar por inversión. Al alcanzar temperatura ambiente se le añade 213g de la solución stock de molibdato de amonio y 72,0g de la solución stock de tartrato de antimonio y potasio. Mezclar y desgasificar. Preparar este reactivo semanalmente.

8.4. **Solución de ácido ascórbico:** en un recipiente de 1L colocar 60,0 g de ácido ascórbico granulado y 975 g de agua. Revolver o agitar hasta disolución. Desgasificar y luego añadir 1,0 g de dodecil sulfato [$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$] mezclando suavemente. Esta solución debe ser preparada semanalmente. Descartar si la solución se torna amarilla.

8.5. **Solución estándar de ortofosfato 10 mg P/L:** pesar 43,9mg de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) previamente secado a 105°C durante 1 hora, disolver y llevar a 200mL con agua (8.7). También es posible preparar esta solución a partir de material de referencia Certificado (MRC) realizando las diluciones correspondientes. Esta solución es estable por 6 meses. A partir de la solución de 10mg P/L se realizan las diluciones pertinentes con agua desionizada (8.7) para la realización de la curva de calibración.

8.6. **Solución Control de ortofosfato 50 mg P/L:** la misma se prepara de acuerdo a lo establecido en la versión vigente del Procedimiento de Preparación de Soluciones Control (PGC 04) que se encuentra en el Manual de Control de Calidad Analítico del Laboratorio de la DINAMA. Se pesan 219,5 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0) previamente secado a 105°C durante 1 hora y se lleva a 1000 mL con agua (8.7). Esta solución es estable por 6 meses.

8.7. Agua desionizada (ES 01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material utilizado debe ser lavado sin detergente y enjuagado previamente con HCl (1+1).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de al menos 4 estándares más un blanco de forma de cubrir el rango deseado a partir de la dilución de la solución (8.5).

Concentración (mg P/L)	Masa del estándar 10 mg P/L (g)	Masa final (g)
0,000	0,000	50,000
0,007 (LD)	0,037	50,000
0,022 (LC)	0,110	50,000
0,050	0,250	50,000
0,200	1,000	50,000
0,500	2,500	50,000
1,000	5,000	50,000
2,000	10,000	50,000

Nota: se asume una densidad de 1 g/mL.

10.2. Encender el equipo de inyección en flujo y abrir el software correspondiente en la PC.

10.3. Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

10.4. Verificar que el manifold se encuentre seteado con los parámetros correspondientes para la determinación de ortofosfato.

10.5. Colocar uno a uno y en el orden que aparecen en el manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar por unos minutos hasta alcanzar una línea de base estable.

10.6. Colocar un blanco de agua 8.7, los estándares de la curva de calibración y el control en los tubos del rack del autosampler en el orden apropiado. Se recomienda comenzar con el blanco de agua 8.7 y luego del estándar de menor a mayor concentración. Ingresar la información requerida por el sistema tal como las concentraciones.

10.7. Verificar en la PC, en el ícono de la configuración del instrumento, que esté correctamente seteado el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.

10.8. Calibrar el instrumento mediante la inyección de los estándares. El software luego asocia las concentraciones con la señal para cada estándar.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Colocar una porción de cada muestra a analizar o la dilución correspondiente en los tubos del rack del autosampler (enjuagar previamente cada tubo con la muestra a ser contenida en el mismo)

11.2. Las muestras de aguas naturales se analizan en forma directa (sin dilución).

11.3. Para efluentes cargados se aconseja realizar una dilución de 10 o 15 veces aproximadamente. Realizar y registrar la masa de la muestra y la masa final de la dilución en el RFQ 49.

11.4. Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.

11.5. No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo de la técnica.

11.6. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

11.7. Al culminar, se procede a apagar el detector y se colocan todas las líneas en agua 8.7 por unos 15 minutos. Luego se deja circular aire hasta sequedad de la cañería y se apaga la bomba y la fuente general de energía.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración Área en función de la Concentración y calcula la concentración de los controles y las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no ha habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.

12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar un control de la curva de calibración de aproximadamente 0,5mgP/L a partir de la Solución Control de 50mg/L (8.6). Analizar el control en la secuencia luego de la curva de calibración, cada 5 muestras de efluentes ó 10 muestras de aguas, y al final de toda la secuencia. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los criterios establecidos en la validación (90-110%) hasta obtener los datos suficientes para generar el gráfico de control correspondiente. Si algún resultado de los siguientes controles está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. Adicionalmente, verificar que la concentración obtenida para cada estándar de la curva de calibración cumple con el criterio de aceptación definido. El estándar de menor concentración (LD) debe recuperar entre (50 – 150)%, y los demás estándares entre (90 – 110)%. En caso contrario la curva de calibración deberá construirse a partir del estándar que cumpla con dicho criterio de aceptación.

13.3. **Control de la precisión:** Realizar por duplicado una de cada 5 muestras de aguas y una de 3 muestras de efluentes. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control estadístico según el criterio de 10% de aceptación establecido en la validación hasta contar con datos suficientes para construir el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.4. **Porcentaje de recuperación:** En un recipiente adecuado pesar aproximadamente 50g de la muestra a ser analizada y fortificar con 150µL de Solución (8.6), tomados con pipeta de (10 – 1000)µL. Registrar ambos pesos en RFQ 49. Si los efluentes fueron diluidos se debe fortificar la dilución y no la muestra original. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos se encuentren bajo control estadístico 90-110% según el criterio tomado en la validación hasta contar con los datos suficientes para construir el gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. LACHAT, QuikChem® Method 10-115-01-1-A, Determination of orthophosphate in waters by flow injection analysis colorimetry.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 4500 P Phosphorus, 4500P-A Introduction, 4500P-B Sample Preparation, 4500P-G Flow Injection Analysis for Orthophosphate pp. 479 - 490.

14.3. U.S. Environmental Protection Agency. In: Ohrel RL, Register KM, eds. Volunteer Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual, 2nd ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; 2006. Chapter 14: Salinity. EPA-842-B-06-003. pp. 14-1 a 14-8.

4020UY

Determinación de Sulfato en efluentes industriales y domésticos

Análisis por inyección en flujo (FIA)

Elaborado - R. Mendes

Modificado - C. Grau

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se aplica para la determinación de sulfato en efluentes industriales y domésticos.

Mediante este método analítico se puede cuantificar el contenido de sulfato en el rango de trabajo 8,8 – 2875 mgSO_4/L; aplicando un factor de dilución máximo igual a 25. El rango de la curva de calibración es de 8,8 – 115 mgSO_4/L.

El límite de detección del método es igual a 2,9 mgSO_4/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de la Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso desionizador/purificador Marca Millipore Synergy UV (INE 122)

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16A e INE 16B)

2.7. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (FIA LACHAT 8500 Series 2) (INE 111)

2.8. Procedimiento analítico para muestras ambientales 1017UY: ¨Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos¨.

2.9. Rutas de análisis (RFQ 44 y 45)

2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método para la determinación de sulfato mediante el análisis por inyección en flujo se basa en una reacción colorimétrica donde participa el analito y un complejo formado por bario y azul de metiltimol (MTB).

3.2. Primero al inyectar la muestra en el equipo, la misma pasa a través de una columna de intercambio catiónico de sodio para remover cationes multivalentes que pueda contener.

3.3. Cuando la muestra con cierta concentración de sulfato reacciona con el complejo bario – MTB a un pH de 2,5 – 3,0, se desplaza el bario del azul de metiltimol para producir sulfato de bario y MTB descomplejado.

3.4. Cuando se eleva el pH a 12,5 – 13,0, el quelato de bario – MTB vira a un color azul dando una línea base estable mientras que el MTB descomplejado adquiere un color gris, el cual es medido a 460 nm dando una señal distinta a la de la línea base y es equivalente en términos de moles a la cantidad de sulfato presente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El analista debe utilizar túnica, guantes y lentes de seguridad a la hora de desarrollar el análisis.

4.2. Cada reactivo que sea utilizado para desarrollar este método debe ser considerado como un peligro potencial, procurar que exista la menor exposición posible frente a los mismos y manipularlos con suma precaución tomando las medidas de seguridad pertinentes.

4.3. Por el hecho de que se emplean reactivos inflamables, se debe alejar cualquier fuente de ignición a la hora de realizar el análisis y el analista debe ser el responsable de controlar el equipo mientras que esté en funcionamiento.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los cationes multivalentes, tales como calcio y magnesio, pueden significar una interferencia negativa, debido a que pueden acomplejarse con el azul de metiltimol libre generado tras la producción del sulfato de bario. Esta interferencia es eliminada por la columna de intercambio catiónico de sodio que posee el equipo.

5.2. Muestras con pH menor a 2 deben ser neutralizadas, las muestras ácidas pueden eluír los cationes multivalentes retenidos por la columna.

5.3. La turbidez de las muestras pueden interferir en la señal obtenida del analito. Para eliminar esta interferencia se deben filtrar o centrifugar las muestras previo al análisis.

5.4. El ortofosfato forma un precipitado con el bario a pH elevado. Si se tiene conocimiento de que las muestras poseen un alto contenido de ortofosfato, estudiar la recuperación de las mismas adicionando una cantidad conocida de sulfato.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar aproximadamente 500 mL de muestra en frasco de plástico (polietileno o equivalente) o de vidrio, los cuales deben estar bien lavados y enjuagados con agua desionizada. Las muestras deben preservarse a una temperatura entre 0 y 6 °C. La vigencia del análisis es de 28 días a partir del día de muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza con resolución de 0,1 mg para la preparación de la solución estándar de sulfato

7.2. Balanza con resolución de 0,001 g para toma de muestra y estándares

7.3. Balanza con resolución de 0,01 g para preparación de reactivos

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango 1 – 10 mL y 100 – 1000 µL

7.5. Matraces Erlenmeyer de 150 mL

7.6. Tubos falcón de 50 mL

7.7. Equipo de filtración

7.8. Filtros de acetato de celulosa y tamaño de poro 0,45 µm

7.9. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold para la determinación de Sulfato, provisto de columna de intercambio catiónico de sodio (LACHAT QuickChem 8500 series 2)

7.10. Desionizador de agua

8. REACTIVOS

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

8.2. Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) CAS N° 7757-82-6

8.3. Cloruro de bario dihidratado ($BaCl_2.2H_2O$) CAS N° 10326-27-9

8.4. Ácido clorhídrico concentrado (HCl) CAS N° 7647-01-0

8.5. Azul de metiltimol sal sódica ($C_{37}H_{40}N_2Na_4O_{13}S$) CAS N° 1945-77-3

8.6. Etanol anhidro desnaturalizado (C_2H_6O) CAS N° 64-17-5

8.7. Hidróxido de sodio (NaOH) CAS N° 1310-73-2

8.8. Cloruro de amonio (NH_4Cl) CAS N° 12125-02-9

8.9. Cloruro de calcio anhidro ($CaCl_2$) CAS N° 10043-52-4

8.10. Hidróxido de amonio (NH_4OH) CAS N° 1336-21-6

8.11. EDTA tetrasódico dihidratado ($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8.2H_2O$) CAS N° 10378-23-1

8.12. EDTA disódico dihidratado ($C_{10}H_{14}N_2O_8.2Na.2H_2O$) CAS N° 6381-92-6

8.13. Resina de intercambio iónico BIOREX 70 50 – 100 mesh

8.14. **Solución estándar de sulfato de 1000 mgSO_4/L**

Secar aproximadamente 2 g de sulfato de sodio a 105ºC durante una noche y dejar enfriar en un desecador. Pesar 1,479 g de sulfato de sodio previamente secado en un matraz aforado de 1 L, disolver en aproximadamente 800 mL de agua 8.1 y diluir hasta el aforo. Homogeneizar.

8.15. **Solución control de sulfato de 1000 mgSO_4/L**

Secar aproximadamente 2 g de sulfato de sodio a 105ºC durante una noche y dejar enfriar en un desecador. Pesar 1,479 g de sulfato de sodio previamente secado en un matraz aforado de 1 L, disolver en aproximadamente 800 mL de agua 8.1 y diluir hasta el aforo. Homogeneizar.

Nota 1: El reactivo con el cual se prepare la solución estándar debe ser de distinta marca o al menos de distinto lote del que se utiliza para preparar la solución control.

8.16. **Carrier – 0,30 mgSO_4/L**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L, agregar 0,30 mL de la solución 8.14 y diluir hasta el aforo con agua 8.1. Homogeneizar.

Preparación por Peso:

En un recipiente de 1 L, pesar 0,30 g de la solución 8.14 y agregar 999,7 g de agua 8.1. Agitar hasta lograr una completa disolución.

8.17. **Solución de Cloruro de Bario – 6,24 mM**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,526 g de cloruro de bario dihidratado en aproximadamente 500 mL de agua 8.1. Llevar a aforo y homogeneizar.

Preparación por Peso:

En un recipiente de 1 L, agregar 1,526 g de cloruro de bario dihidratado y agregar 995 g de agua 8.1. Agitar hasta lograr una completa disolución.

8.18. **Ácido clorhídrico – 1,0 M**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L, agregar aproximadamente 800 mL de agua 8.1 y luego adicionar 83 mL de ácido clorhídrico concentrado. Diluir hasta el aforo y homogeneizar.

Preparación por Peso:

En un recipiente de 1 L, agregar a 913 g de agua 8.1 99,6 g de ácido clorhídrico concentrado. Agitar para homogeneizar.

8.19. **Reactivo Azul de metiltimol – Bario**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 500 mL, colocar 0,236 g de azul de metiltimol sal sódica. Agregar 50 mL de la solución de cloruro de bario 8.17. Agitar para disolver el reactivo colorante. Con una pipeta graduada, agregar 4 mL de ácido clorhídrico 1.0 M. La solución vira del color azul al naranja al homogeneizar. Adicionar 71 mL de agua 8.1 y llevar a aforo con etanol. Homogeneizar. El pH de este reactivo debe ser de 2.5. Esta solución debe ser preparada el día antes de ser utilizada y debe ser almacenada bajo refrigeración en un frasco de color ámbar. El reactivo debe utilizarse a temperatura ambiente.

Preparación por Peso:

En un recipiente de 500 mL de color ámbar, pesar 0,236 g de azul de metiltimol sal sódica. Agregar 50 g de la solución de cloruro de bario 8.17. Agitar para disolver el reactivo colorante. Agregar 4,0 g de ácido clorhídrico 1,0 M. La solución vira del color azul al naranja al homogeneizar. Adicionar 71 g de agua 8.1 y 321 g de etanol. Agitar hasta lograr una completa disolución. El pH de este reactivo debe ser de 2.5. **Esta solución debe ser preparada el día antes de ser utilizada** y debe ser almacenada bajo refrigeración en un frasco de color ámbar. El reactivo debe utilizarse a temperatura ambiente.

Nota 2: Se debe procurar que tanto la calidad del azul de metiltimol como la del etanol sea la mejor posible, ya que la pureza de estos reactivos es crítica para el análisis.

8.20. **Solución stock de hidróxido de sodio – 2,5 M**

En un matraz aforado de 1 L, disolver 100,0 g de hidróxido de sodio en 800 mL de agua 8.1. Dejar que la solución llegue a temperatura ambiente y diluir hasta el aforo. Homogeneizar.

8.21. **Solución de trabajo de hidróxido de sodio – 0,18 M**

Agregar 72 mL de la solución stock de hidróxido de sodio en aproximadamente 900 mL de agua 8.1 en un matraz aforado de 1L. Diluir hasta el aforo y homogeneizar.

8.22. **Buffer EDTA de limpieza**

8.23. Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L, agregar 6,75 g de cloruro de amonio y aproximadamente 500 mL de agua 8.1. Adicionar 57 mL de hidróxido de amonio y 40.0 g de EDTA tetrasódico dihidrato o 35,8 g de EDTA disódico, agitar hasta disolución y llevar a aforo. Homogeneizar.

Preparación por Peso:

En un recipiente de 1 L, pesar 6,75 g de cloruro de amonio y 912 g de agua 8.1. Agregar 51,3 g de hidróxido de amonio y 40,0 g de EDTA tetrasódico dihidrato o 35,8 g de EDTA disódico. Agitar hasta lograr una completa disolución.

8.24. **Solución de calcio 1000 mgCa/L**

En un matraz aforado de 250 mL, pesar 0,692 g de cloruro de calcio y disolver en aproximadamente 150 mL de agua 8.1. Agitar hasta disolución y llevar a aforo. Homogeneizar.

8.25. **Solución de hidróxido de sodio 10 N para ajuste de pH**

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL, pesar 40 g de hidróxido de sodio y disolver en 100 mL de agua 8.1. Agitar hasta disolución. Tener en cuenta que al preparar la solución se lleva a cabo una reacción exotérmica por lo que se debe preparar la misma en un baño de agua.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Al comienzo de cada día de análisis, en lo posible utilizar tubos de reactivos (azul de metiltimol, hidróxido de sodio, carrier) y el de muestra nuevos, con el fin de evitar que ocurran anomalías en la línea base o derrames por ruptura a la hora de analizar las muestras.

9.2. Asegurarse que los tubos de la línea del reactivo azul de metiltimol - bario sean de teflón. El etanol del reactivo de azul de metiltimol – bario deteriora los tubos estándares de tygon, teniendo como consecuencia derrames en el equipo.

9.3. El balance entre la concentración de azul de metiltimol y el ion Bario es crítico. Si la concentración de Bario es demasiado alta, el límite de detección se verá afectado, mientras que si la concentración de azul de metiltimol es demasiado alta en comparación con el bario, la línea base aumentará y la señal de sulfato será más baja. La pureza del azul de metiltimol es crítica para el análisis.

9.4. Si las señales de los estándares de la curva de calibración son más bajas de lo habitual, reemplazar el tubo negro “acid flex” de la bomba correspondiente a la línea del azul de metiltimol.

9.5. Las muestras no deben contener sólidos suspendidos ni presentar turbidez antes de ser inyectadas en el FIA. Para evitar que esto ocurra, éstas deben ser filtradas con un filtro de acetato de celulosa de tamaño de poro 0,45 µm.

9.6. Al realizar una corrida de análisis de sulfato, se debe verificar la efectividad de la columna de intercambio catiónico de sodio para remover los cationes multivalentes. Para esto, se debe analizar un control de sulfato con una concentración típica de dureza que puedan contener las muestras; en esta metodología se considera el nivel de dureza para realizar el control de dureza igual a 150 mgCa/L. La concentración de sulfato del control de la columna debe recuperar en más de un 90 %, en caso contrario se debe cambiar la resina de la columna.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar los siguientes estándares de curva de calibración de acuerdo a la siguiente tabla utilizando una balanza de resolución de 0,001 g, a partir de un estándar intermedio de 100 mg SO_4/L, preparado a partir de un material de referencia certificado o de la solución 8.14.

Toma estándar intermedio (g)	Volumen final (g)	Concentración aprox. de estándar de curva (mgSO_4/L)
0	50,0	0
1,50	50,0	3,0
4,50	50,0	9,0
7,50	50,0	15
10,0	50,0	20
15,0	50,0	30
20,0	50,0	40
30,0	50,0	60
40,0	50,0	80
47,5	50,0	95
50,0	50,0	100
5,75	50, 0	115

Nota 3: El estándar de curva de concentración 115 mgSO_4/L se prepara realizando una toma directa de la solución 8.14 o el material de referencia.

10.2. Preparar soluciones control a partir de un material de referencia certificado o a partir de la solución 8.15, de acuerdo a las siguientes diluciones.

Concentración estándar (mgSO_4/L)	Toma estándar (g)	Volumen final (g)	Concentración control (mgSO_4/L)
1000	0,625	25	25
1000	2,125	25	85

Nota 4: Se asume densidad igual a 1 g/mL del material de referencia certificado, solución estándar y los estándares de curva de calibración.

10.3. Preparar solución control de columna a partir de un material de referencia certificado o a partir de la solución 8.15, de acuerdo a la siguiente dilución.

Concentración estándar (mgSO_4/L)	Toma estándar (g)	Toma solución 1000 mgCa/L (g)	Volumen final (g)	Concentración control (mgSO_4/L)
1000	0,625	3,75	25	25

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Preparación de la muestra para realizar la determinación instrumental

11.1. Para analizar los efluentes, si es necesario, aplicar un factor de dilución mínimo de 5 y máximo de 25.

11.2. Al realizar la dilución de los efluentes, registrar el peso de la toma de muestra previamente filtrada y el peso del volumen final en el RFQ 44.

11.3. Medir el pH de la muestra según Procedimiento analítico para muestras ambientales 1017UY, en el caso de que el valor de pH sea menor a 2, neutralizarla con hidróxido de sodio 10 N y registrar su peso después del ajuste en el RFQ 44.

Determinación instrumental

11.4. Encender el equipo de inyección de flujo, chequear que las revoluciones por minuto de la bomba sean igual a 35 y las líneas estén tensionadas correctamente.

11.5. Verificar que **la columna esté fuera de línea** y colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua 8.1 y hacer circular por todo el sistema unos minutos. Chequear que no existan pérdidas en el Manifold y que esté circulando líquido por todas las líneas sin la presencia de burbujas de aire.

11.6. Colocar las líneas en sus respectivos reactivos en el orden que aparecen en el Manifold y hacerlos circular por el sistema durante al menos 4 minutos. Abrir la válvula de la columna de manera que se encuentre en línea y dejar circulando los reactivos hasta que se logre una línea base estable. Verificar que la línea de base con reactivos esté entorno a los 2,5 V.

11.7. Realizar una alícuota de las muestras a analizar y colocarlas en los tubos del rack del autosampler, después de haber colocado los estándares de curva de calibración (menor a mayor concentración), blanco (solo agua 8.1) y controles.

11.8. Verificar en el programa que esté seteado correctamente el modelo del rack del autosampler que se esté utilizando.

11.9. Ingresar en el programa del sistema la secuencia de análisis deseada con los valores de concentración de los estándares, control de columna y controles de sulfato. Una vez finalizada la secuencia de análisis se detiene automáticamente y eventualmente queda listo para comenzar otra secuencia.

11.10. Si no se va a realizar otra corrida de análisis, cambiar la posición de la válvula de manera que **la columna esté fuera de línea**, y colocar todas las líneas de reactivos en el Buffer EDTA de Limpieza durante 5 minutos, luego de haber culminado la limpieza con Buffer, colocar todas líneas en agua 8.1 y dejar circular durante 15 a 30 minutos. Por último, quitar todas las líneas del agua y dejar la bomba encendida para que circule aire durante 15 a 30 minutos de manera de secar las líneas del Manifold.

11.11. Apagar todo el equipo y distender los tubos que pasan por la bomba.

Nota 5: Al comienzo y final de cada secuencia de análisis se deben realizar al menos tres lavados con agua 8.1, con el objetivo de eliminar cualquier residuo que pudiera quedar en las líneas del Manifold, particularmente en la columna.

Nota 6: En el caso que ingresen burbujas de aire en la columna o la línea base no se estabilice cuando se pasan reactivos por el Manifold teniendo la columna en posición en línea, hacer circular abundante carrier por la misma hasta observar que hayan desaparecido las burbujas de aire y la línea base no presente anomalías.

Nota 7: Si el porcentaje de recuperación del control de la columna es menor al 85 %, preparar una nueva resina pesando 0,5 g de BIOREX 70 y agregar suficiente agua para generar una consistencia lodosa. Empaquetar la columna, retirando el extremo final de ésta y rellenándola con la mezcla preparada teniendo la precaución de que no ingresen burbujas de aire dentro de la columna. Dejar decantar la resina y tapar el extremo asegurándose de que quede bien sellada.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración señal en función de la concentración (función de tercer grado), y calcula la concentración de los controles y muestras.

Comprobar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no exista ninguna anomalía en la secuencia. Generar el reporte de la secuencia en el programa y guardarlo en la carpeta correspondiente.

Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a las tomas de muestras y factor de dilución en el caso de que se hayan aplicado diluciones y se haya ajustado el pH de las muestras.

$$[Sulfato](mg\ SO_4/L) = [Sulfato]_{CURVA} \times FD$$

Nota 8: Aunque el programa utilizado construya automáticamente la curva de calibración, se debe verificar que la misma tenga un coeficiente de correlación que cumpla con el criterio de aceptación definido ($R^2 \geq 0{,}995$) y que la curva con los puntos elegidos cubran el rango de concentración de la muestra, considerando al menos 5 puntos. Volver a integrar todos los picos con la nueva curva de calibración.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud:** Si se dispone de un material de referencia certificado. Obtener el resultado del porcentaje a partir de la planilla de cálculo electrónica, comprobando así que cumpla con el criterio de aceptación 85 % – 115 %, hasta obtener datos suficientes para elaborar un gráfico de control. Si algún valor no cumple con los criterios de calidad establecidos, proceder según el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Analizar al menos un duplicado cada día de análisis y uno cada 5 efluentes analizados. El rango normal calculado para las muestras debe estar bajo control, siendo 10 % el valor máximo aceptado de dispersión (para muestras cuantificables) hasta la obtención de datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún valor no cumple con los criterios de calidad establecidos, proceder según el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Control de porcentaje de recuperación:** Realizar una fortificación de cada efluente analizado, agregando a 25 mL de muestra o dilución de la misma, 150 µL de una solución de 1000 mg SO_4/L. El porcentaje de recuperación debe estar en el rango 85 – 115 %, hasta que se obtengan datos suficientes para elaborar un gráfico de control. Si algún valor no cumple con los criterios de calidad establecidos, proceder según el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.4. **Control de blancos:** La señal del blanco analizado debe tener una señal inferior a la señal correspondiente al límite de detección del método.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. LACHAT QuickChem Method 10-116-10-2-A. Determination of Sulfate by Flow Injection Analysis Colorimetry (Methylthymol Blue method) Version Aug 2003.

14.2. EPA Method 375.2: Determination of Sulfate by Automated Colorimetry. Revision 2.0.

14.3. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Sulfate 4500 – SO42- G. Methylthymol Blue Flow Injection Analysis pp 507-509.

4029UY

Determinación de aniones inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales líquidos

Método Cromatografía Iónica sin supresión de la conductividad



Elaborado - V. Muñoz

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de aniones inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales líquidos.

1.2. Los límites de cuantificación son los siguientes: fluoruro 0,1 mg/L, cloruro 0,1 mg/L, nitrato 0,1 mg/L y sulfato 0,2 mg/L. Los límites de detección son: cloruro 0,01 mg/L, nitrato 0,01 mg/L y sulfato 0,05 mg/L. Para el caso de efluentes industriales, los límites podrán ser superiores dependiendo de las características de la matriz.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso del Shimadzu HIC-20Asuper (INE 104).

2.6. Instructivos de uso de balanzas (INE 07, INE 06, INE 115).

2.7. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.8. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122).

2.9. Instructivo de baño con ultrasonido (INE 108, INE 134).

2.10. Rutas de análisis (RIN 41 y RIN 13).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los aniones de interés son separados según su afinidad relativa en una columna de intercambio aniónico. Luego, los aniones separados son introducidos en dispositivo que suprime la conductividad de la fase móvil y convierte los aniones en sus formas ácidas altamente conductoras aumentando la respuesta al analito. La detección se realiza con un detector de conductividad. La identificación de los aniones de interés se realiza comparando los tiempos de retención en el cromatograma con el de los estándares respectivos inyectados en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área o altura de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de algún ión a determinar y produzca señal en el detector, será una interferencia. Por ejemplo, altas concentraciones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular pueden interferir con la determinación de fluoruro y cloruro.

5.2. Altas concentraciones de cualquiera de los iones a determinar, puede interferir con la determinación de un ión cuyo tiempo de retención sea cercano, la dilución de la muestra puede superar la interferencia.

5.3. La elución del fluoruro puede darse cerca de la depresión de la línea de base causada por la elución del agua (water dip), puede causar dificultades en la cuantificación de muestras con baja concentración de este anión. La dilución de la muestra con fase móvil concentrada puede resolver esta interferencia, en este caso los estándares deberán ser tratados de igual manera.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) de 0,5 L de capacidad, con cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Si se va a determinar nitrato, realizar el análisis tan pronto como sea posible (48 horas) manteniendo la muestra a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Para la determinación de sulfato, fluoruro y cloruro, el tiempo de análisis es de hasta 28 días manteniendo la muestra a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo iónico líquido, Shimadzu HIC20Asuper compuesto por:

- Bandeja para los reservorios de fase móvil
- Desgasificador de fase móvil en línea (DGU-20 A3R)
- Bomba para la fase móvil (LC-20ADsp)
- Inyector automático SIL-10 Ai con loop de 50 µL.
- Horno para Columna (CTO-20ACsp)
- Detector de conductividad (CDD-10Asp)
- Dispositivo de comunicación (CBM-20 A)
- Precolumna Shim-pack IC-SA2G ó similar (opcional)
- Columna aniónica Shim-pack IC-SA2, diámetro interno 4,0 mm; largo 25 cm ó equivalente.
- Cartuchos Supresores de la conductividad (P/N228-40612-91)

7.2. Equipo de ultrasonido.

7.3. Balanza de resolución 0,00001 g.

7.4. Balanza de resolución 0,001 g.

7.5. Balanza de resolución 0,0001 g.

7.6. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm.

7.7. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

7.8. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.

7.9. Micropipetas automáticas de volumen variable.

7.10. Tubos descartables de plástico con tapa de 10 mL y 50 mL de capacidad.

7.11. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).

8.2. Solución de elución concentrada $NaHCO_3$ 120 mM /Na_2CO_3 6 mM: disolver 5,040 g de $NaHCO_3$ y 0,318 g de Na_2CO_3 llevar a 500 mL con agua 8.1.

8.3. Soluciones stock de estándares, 1000 mg/L: Secar hasta peso constante a 105 °C las sales indicadas en la tabla adjunta. Pesar con resolución de 0,1 mg lo indicado en la siguiente tabla, y diluir por peso con agua 8.1 a 50 mL en tubo de plástico de 50 mL. Preservar a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C), hasta 6 meses. Los valores indicados a continuación son como guía para la preparación del estándar, el valor real debe ser registrado en la planilla RIN 13 “Planilla de Datos de Preparación de estándares”. Alternativamente utilizar soluciones estándares comerciales de trazabilidad adecuada.

Anion	Sal	Peso (g)
Fluoruro	NaF Nro. CAS 7681-49-4	0,1105
Cloruro	NaCl Nro. CAS 7647-14-5	0,0824
Nitrato	$NaNO_3$ Nro. CAS 7631-99-4	0,0685
Sulfato	K_2SO_4 Nro. CAS 7778-80-5	0,0910

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Las determinaciones en aguas de lluvia son a niveles de trazas, por lo que hay que extremar cuidados para evitar la contaminación.

9.2. Todo el material de plástico debe ser en lo posible descartable.

9.3. El resto del material debe ser lavado por enjuague con agua 8.1 sin utilizar ácidos ni detergentes. En caso de contener material sólido adherido usar solventes orgánicos para removerlos y luego enjuagar tres veces con agua 8.1.

9.4. Las muestras deben filtrarse en el sector destinado para aniones.

9.5. La fase móvil debe filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.

9.6. El recipiente para la fase móvil debe ser sonicado con agua 8.1 durante 10 min, previo a su llenado con la fase móvil.

9.7. Las muestras deben filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, previo a su introducción en el IC.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar por lo menos 5 soluciones estándares conteniendo mezcla de los aniones que se quieren determinar y un blanco, por dilución de la solución stock de estándares con agua 8.1. Utilizar estándares de manera de abarcar las concentraciones de aniones esperadas para las muestras analizadas. Preparar estas soluciones mensualmente (registrar en la Ruta de Análisis 41).

10.2. Identificar en el cromatograma de cada estándar el pico correspondiente a cada anión y realizar la gráfica de área o altura del pico en función de la concentración en mg/L para cada anión.

10.3. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras y al final de la corrida inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

Nota 2: La preparación de los estándares y de la dilución de las muestras debe hacerse en la balanza analítica de resolución 0,01 mg. Se considera la densidad de las soluciones 1 g/mL debiendo corregir en los cálculos correspondientes en caso que no se cumpla.

Nota 3: En caso de que la concentración esperada de los aniones, se encuentren cercanos a los límites de detección/cuantificación, incluir la concentración del límite de cuantificación como una de las 5 soluciones estándares de la curva de calibración y adicionar una solución con la concentración correspondiente al límite de detección para evaluar la señal a la hora de definir el límite de reporte.

Nota 4: El orden de elución de los aniones, es el siguiente: fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, ortofosfato y sulfato. En caso de dudas en la identificación de los picos preparar estándares para cada anión por separado para establecer los tiempos de retención correspondientes.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Operaciones previas

11.1.1. Preparación de la fase móvil:

Diluir 10 veces la solución de elución concentrada 8.2 con agua 8.1 (usar agua 8.1 preparada en el día). Filtrar por vacío con filtro de 0,45 µm. Rellenar el reservorio para la fase móvil y el reservorio de enjuague del inyector con agua 8.1.

11.1.2. Encendido del equipo:

Seguir las instrucciones de operación indicadas en el instructivo de uso para el cromatógrafo (INE 104) para encendido y manejo del mismo.

Ajustar a las siguientes condiciones operativas:

T horno de columna = 40 °C

T detector = 43 °C

Ganancia del Detector = 0,1 o 1,0 (según matriz analizada, ejemplo 0,1 para agua de lluvia y 1,0 para efluentes industriales o aguas naturales en las que se prevea mayor concentración de aniones.)

Respuesta: 1 sec

Flujo de bombeo de fase móvil = 1,1 mL/min

LC stop time 18:00 min (verificar que todos los picos salgan en ese tiempo)

Tipo de cartucho (Cartridge type): 312

Concentración (Concentration): 14,0 meq/L

Tiempo de demora de la inyección (Injection delay time): 4,5 min

Intervalo de cambio del supresor (Suppressor switching interval): 23 min

Tiempo de regeneración del supresor (Regeneration time): 8,8 min

Nota 5: Cuando el equipo alcanza las condiciones de medida indica LC Ready.

11.1.3. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 5000 µV/min y no posea un ruido superior a 50.00 µV. Estos parámetros se chequean desde el software con el test del "Baseline check". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 45 min y depende de la ganancia del detector seleccionada.

11.2. Filtrar las muestras para eliminar partículas por filtro con 0,45 µm de tamaño de poro.

11.3. Crear la secuencia de medición en el equipo (batch table) según el instructivo de uso del equipo INE 104, incluyendo los estándares, las muestras y los controles de calidad.

11.4. Si el área de cada anión de interés está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.1. Si el área de algún anión es mayor a la correspondiente al último punto de la curva de calibración para ese anión proceder a diluir la muestra con agua 8.1 (registrar las diluciones realizadas en el RIN 41) o alternativamente realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.

11.5. Si la línea de base de la muestra es muy inestable, por ejemplo por la presencia de altas concentraciones de aniones orgánicos que hacen dudar de la cuantificación de algún anión (especialmente cloruro y fluoruro) verificar su concentración por dilución o por adición de una cantidad conocida del anión de interés.

11.6. Luego de finalizado el análisis apagar el cromatógrafo según el instructivo INE 104.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración teniendo en cuenta la toma, el volumen final y la concentración de la solución stock de estándares.

12.2. Calcular en caso de ser necesario los factores de dilución correspondientes a las muestras analizadas.

12.3. Calcular la concentración de cada anión en mg/L interpolando en la curva de calibración correspondiente (área o altura en función de la concentración).

$$X,\ mg/L = \frac{(A - O) \times FD}{P}$$

donde:

X: corresponde a la concentración del anión de interés

A: corresponde a la área o altura del pico del anión de interés en la muestra

P: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

O: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

Nota 6: Estos cálculos son realizados por el software del equipo una vez que se ingresan las concentraciones de los estándares de calibración y los factores de dilución de las muestras.

12.4. Calcular la recuperación de la adición de las muestras fortificadas según:

$$\%\ \text{recuperación de la adición} = \frac{(X_f - X)}{S} \times 100$$

donde:

X_f: corresponde a la cantidad de analito en la muestra fortificada (mg)

X: corresponde a la cantidad de analito en la muestra sin fortificar (mg)

S: corresponde a la cantidad de analito en el volumen de estándar adicionado (mg)

12.5. Si el área o altura del pico cromatográfico para cada anión de interés en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.

12.6. Si el área o altura del pico cromatográfico del anión de interés de la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación del anión (referencia: "Manual de Control de Calidad Analítico", Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 7: Cuando, por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias. Ver 13.4.

Nota 8: Los datos de área o altura de pico y tiempo de retención se obtienen del reporte de la corrida generado en el software del equipo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. El coeficiente de correlación de la curva utilizada deberá ser $R^2 \geq 0,99$ y la regresión de los puntos de calibración en la curva deberá estar dentro del ± 10 % del valor real de concentración del estándar.

13.2. Control de veracidad de la determinación: Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar de concentración similar a la mitad del rango de la curva, preparado desde una fuente independiente a la utilizada para la construcción de la curva (registrar en el RIN 41). Podrá utilizarse una solución de control interno o un material de referencia. La recuperación del valor de concentración real deberá estar dentro del ± 15 %, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.3. Control de recuperación de la matriz fortificada: Fortificar una de cada veinte muestras o por lo menos una por batch, con un volumen conocido de una solución estándar de manera que el agregado no aumente el volumen más del 5 % de la toma de muestra fortificada y de manera que la concentración final este dentro del rango de calibración del equipo de lo contrario diluir la muestra fortificada para llevarla al rango de calibración. Procesar la muestra fortificada a través de toda la metodología (registrar la adición en RIN 41). La recuperación del analito agregado deberá estar entre 85 - 115 % del valor agregado, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.4. Control de la precisión: Se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una de cada veinte muestras, o por lo menos un duplicado por batch. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un Rango Normalizado de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.

13.5. Control de blancos: la concentración de los analitos en la solución blanco deberá estar por debajo de la mitad del límite de reporte (siendo el límite de reporte el Límite de Detección/Cuantificación según el caso).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 4110 B Ion cromatography with chemical suppression of eluent conductivity pp.309-311.

14.2. Manuales de Cromatógrafo iónico líquido, Shimadzu HIC20Asuper (1404 SHIc 05242-51).

4030UY

Determinación de Aniones Inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales

Método Cromatografía Iónica (HPLC)

Elaborado - G. Medina

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director Div. Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de aniones inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales.

1.2. Los límites de detección de este método son fluoruro 0,05 mg/L, nitrato 0,1 mg/L, fosfato 0,6 mg/ L, cloruro 0,01 mg/L y sulfato 0,2 mg/L. Los límites de cuantificación son fluoruro 0,2 mg/L, nitrato 0,5 mg/L, fosfato 0,9 mg/ L, cloruro 0,06 mg/L y sulfato 1,1 mg/L. Para el caso de efluentes industriales, los límites podrán ser superiores dependiendo de las características de la matriz.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Procedimiento: "Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos." (1017UY)

2.6. Instructivo de uso del HPLC Shimadzu (INE 45)

2.7. Instructivo de uso de balanza de plato abierto Precisa, de resolución 0,001 g (INE 06).

2.8. Instructivo de uso de balanza analítica Sartorius, de resolución 0,00001 g (INE 07).

2.9. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.10. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.11. Instructivo de uso de baño con ultrasonido Branson Modelo 3510 (INE 69)

2.12. Instructivo de uso de pHmetro (INE 10 e INE 98)

2.13. Ruta de análisis (RIN 02 y RIN 13)

2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los aniones de interés son separados según su afinidad en una columna de intercambio aniónico, en un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC). La detección se realiza con un detector de conductividad. La identificación de los aniones de interés se realiza comparando los tiempos de retención en el cromatograma, con el de los estándares respectivos inyectados en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área o altura de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.2. El agregado de metanol para la preparación en los reactivos debe realizarse bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de algún ión a determinar y produzca señal en el detector será una interferencia. Por ejemplo, altas concentraciones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular pueden interferir con la determinación de fluoruro y cloruro.

5.2. Altas concentraciones de cualquiera de los iones a determinar, puede interferir con la determinación de un ión cuyo tiempo de retención sea cercano.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno o polipropileno de 0,5 L de capacidad de cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Si se va a determinar nitrato y/o fosfato, el frasco debe ser lavado sin detergente y se debe realizar el análisis tan pronto como sea posible (48 horas) manteniendo la muestra a ≤ 6 °C (> 0 °C). Para la determinación de sulfato, fluoruro y cloruro, el tiempo de análisis es de hasta 28 días manteniendo la muestra a ≤ 6 °C (> 0 °C).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo líquido de alta performance, marca Shimadzu (INE 45), compuesto por:

Bomba pistón (LC-10AT)

Horno para Columna (CTO-10A)

Inyector con loop de 100 µL

Detector de conductividad (CDD-6A)

Precolumna (opcional) y columna aniónica tipo Hamilton PRP-X100, tamaño de partícula 10 µm, diámetro interno 4,1 mm, largo 15 cm ó equivalente.

7.2. Equipo de ultrasonido para desgasificar el eluente o método de desgasificación equivalente.

7.3. Balanza analítica de precisión de al menos 0,1 mg.

7.4. Analizador de iones.

7.5. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm

7.6. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

7.7. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.

7.8. Agitador magnético y barras agitadoras.

7.9. Micropipetas automáticas de volumen variable.

7.10. Tubos descartables de plástico con tapa de 10 mL y 50 mL de capacidad.

7.11. Jeringa de 250 µL de vidrio, marca SGE o similar.

8. REACTIVOS

8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).

8.2. Solución stock de eluente concentrado: disolver 2.75 g de ácido p-hidroxibenzoico ($C_7H_6O_3$ Nro. CAS 99-96-7 PA) en 125 mL de metanol (CH_4O Nro. CAS 67-56-1 calidad HPLC), diluir a 1000 mL con agua HPLC. Almacenar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta 3 meses.

8.3. Soluciones buffer de pH 4, 7 y 10 para la calibración del electrodo.

8.4. Soluciones stock de estándares, 1000 mg/L: Secar hasta peso constante a 105 °C las sales indicadas en la tabla adjunta, pesar con precisión de 0,1 mg lo indicado en la siguiente tabla, y diluir por peso con agua HPLC a 50 mL en tubo de plástico de 50 mL. Preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C), hasta 6 meses. Alternativamente utilizar soluciones estándares comerciales. Los valores indicados a continuación son como guía para la preparación del estándar, el valor real debe ser registrado en la planilla RIN 13 “Planilla de Datos de Preparación de estándares”.

Anión	Sal	Peso (g)
Fluoruro	KF Nro. CAS 7789-23-3	0,1529
Cloruro	NaCl Nro. CAS 7647-14-5	0,0824
Nitrato	$NaNO_3$ Nro. CAS 7631-99-4	0,0685
Fosfato	KH_2PO_4 Nro. CAS 7778-77-0	0,0716
Sulfato	K_2SO_4 Nro. CAS 7778-80-5	0,0910

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Las determinaciones en aguas de lluvia son a niveles de trazas, por lo que hay que extremar cuidados para evitar la contaminación.

9.2. Todo el material de plástico debe ser en lo posible descartable.

9.3. El resto del material debe ser lavado por enjuague con agua HPLC sin utilizar ácidos ni detergentes. En caso de contener material sólido adherido usar solventes orgánicos para removerlos y luego enjuagar tres veces con agua HPLC.

9.4. Las muestras deben filtrarse en el sector destinado para aniones. Tener en cuenta la posibilidad de contaminación cruzada en caso de trabajar en zonas de tratamiento de muestras, donde se utilizan ácidos fuertes.

9.5. La fase móvil debe filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro y desairarse previo a su introducción en el HPLC.

9.6. Las muestras deben filtrarse con filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, previo a su introducción en el HPLC.

9.7. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio, especialmente con muestras digeridas para metales.

9.8. Es recomendable identificar las columnas según la matriz analizada.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar por lo menos 3 soluciones estándares conteniendo mezcla de los aniones que se quieren determinar por dilución de la solución stock de estándares con agua HPLC. Por ejemplo, para aguas de lluvia realizar una curva entre 0,1 y 2 mg/L, y para efluentes industriales entre 0,5 y 10 mg/L. Realizar un estándar con la menor concentración de interés para cada anión.

Nota 2: La preparación de los estándares y de la dilución de las muestras debe hacerse en la balanza analítica de precisión 0,1 mg. Se considera la densidad de las soluciones 1 g/mL debiendo corregir en los cálculos correspondientes en caso que no se cumpla.

10.2. Inyectar los estándares en el loop de 100 µL con la jeringa de 250 µL completamente cargada, para asegurar el loop lleno y el enjuague del mismo. Identificar el pico correspondiente a cada anión y realizar la gráfica de área o altura del pico en función de la concentración en mg/L para cada anión.

10.3. El orden de elución de los aniones, es el siguiente: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato. En caso de dudas en la identificación de los picos preparar estándares para cada anión por separado para establecer los tiempos de retención correspondientes.

10.4. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Operaciones previas

11.1.1. Preparación del eluyente o fase móvil: diluir 5 veces la solución stock concentrada con agua HPLC, ajustar el pH entre 8,55 y 8,61 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N (aproximadamente 5 mL por litro de fase móvil). Filtrar por vacío con filtro de 0,45 µm. Con el vacío conectado desgasificar por lo menos durante 15 min en ultrasonido, hasta no detectar visualmente burbujas de aire en la solución.

11.1.2. Encendido y estabilización del equipo: Seguir las instrucciones de operación indicadas en el equipo para encendido y manejo del mismo.

Ajustar a las siguientes condiciones operativas:

T horno de columna = 40 °C

T detector = 43 °C

Ganancia del Detector = 1,0 (el equipo podrá ser utilizado con ganancia 0,1 siempre y cuando la matriz de la muestra lo permita)

Flujo = 2,0 mL/min

P máx. = a la presión máxima que admite la columna según los datos del fabricante, 1500 psi para la columna utilizada según este procedimiento.

Polaridad: +

11.1.3. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 1000 mV/min. Este parámetro se chequea desde el software con el test del "slope". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 45 min y depende de la ganancia del detector seleccionada.

11.2. Filtrar las muestras para eliminar partículas por filtro con 0,45 µm de tamaño de poro.

11.3. Inyectar las muestras en el loop de 100 µL con el inyector en posición "LOAD", con una jeringa de 250 µL, para asegurar el loop lleno y el enjuague del mismo. Una vez cargado el loop, correr el inyector hasta la posición INYECT.

11.4. Si el área de cada anión de interés está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.4. Si el área de algún anión es mayor al mayor punto de la curva de calibración para ese anión proceder a diluir la muestra con agua HPLC o alternativamente realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.

11.5. Si la línea de base de la muestra es muy inestable, por ejemplo, por la presencia de altas concentraciones de aniones orgánicos que hacen dudar de la cuantificación de algún anión (especialmente cloruro y fluoruro) verificar su concentración por dilución o por adición de una cantidad conocida del anión de interés.

11.6. Luego de finalizado el análisis: apagar el horno y el detector; enjuagar el sistema dejando circular la fase móvil hasta que alcance temperatura ambiente y luego apagar la bomba, según INE 45.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración teniendo en cuenta la toma, el volumen final y la concentración de la solución stock de estándares.

12.2. Graficar el área o altura de cada ión en particular, en función de la concentración calculada en 13.1. La curva de mejor ajuste corresponde a una recta.

12.3. Calcular la concentración de cada anión en mg/L interpolando en la curva de calibración correspondiente (área o altura en función de la concentración).

$$X, mg/L = \frac{(A - O) \times FD}{P}$$

donde:

X: corresponde a la concentración del anión de interés

A: corresponde a la área o altura del pico del anión de interés en la muestra

P: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

O: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

12.4. Si el área o altura del pico cromatográfico para cada anión de interés en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.

12.5. Si el área o altura del pico cromatográfico del anión de interés de la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación del anión (referencia: "Manual de Control de Calidad Analítico", Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 3: Cuando, por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** analizar un material de referencia certificado externo simultáneamente con el set de muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

13.2. **Control de la precisión:** se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una cada cinco muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un RSD de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 4110 C Single Column ion chromatography with direct conductivity detection pp.312-313.

14.2. Manual de Columna PRP x 100 Hamilton.

4051UY

Determinación de sulfuro en efluentes industriales en concentraciones superiores a 0,05 mg/L

Método potenciométrico – Medida directa

Elaborado - G. Medina

Modificado - C. Capeci

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de sulfuro en efluentes industriales en concentraciones en el rango de 0,05 a 10 mg/L. El límite de detección es de 0,03 mg/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 118)

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 94, INE 16B)

2.7. Ruta de análisis (RIN 10)

2.8. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La determinación incluye todo el sulfuro presente como HS-, H_2S y los sulfuros metálicos solubles, todos ellos son convertidos a S-2 con un buffer altamente alcalino y antioxidante. El S-2 obtenido es determinado por medida directa con el electrodo selectivo de plata /sulfuro y electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag+/AgCl), mediante una curva de calibración. Puede utilizarse también un electrodo combinado Ag+/S-2.

3.2. El electrodo de plata /sulfuro consiste de una membrana de sulfuro de plata, unida al cuerpo electródico. Cuando la membrana está en contacto con una solución conteniendo los iones plata o sulfuro, se produce una diferencia de potencial a través de la misma. Dicho potencial depende de la actividad de los iones en solución y es determinado contra un potencial de referencia. El buffer alcalino y antioxidante utilizado produce una fuerza iónica alta y constante, por lo cual la actividad del sulfuro es directamente proporcional a la concentración del ión en solución.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. El buffer alcalino y antioxidante contiene una elevada concentración de hidróxido de sodio (NaOH), es muy corrosivo, por lo cual no debe tomar contacto con la piel y los ojos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los sulfuros de mercurio y plomo son insolubles en las condiciones de medida, por lo que no pueden ser determinados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en recipientes de plástico de 250 mL de capacidad el cual debe contener previamente 125 mL de buffer antioxidante.

6.2. Evitar que quede cámara de aire en el recipiente. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C), proteger de la luz y analizar antes 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).

7.2. Electrodo selectivo de plata /sulfuro (Orion 9416).

7.3. Electrodo de referencia Ag+ /AgCl (Orion 9002), con sus soluciones de relleno: cámara interna Orion 90002, cámara externa Orion 900003.

7.4. Alternativamente al 7.2 y 7.3, es posible utilizar un electrodo combinado Ag/S (Orion 9616BNWP) con su solución de relleno 900062.

7.5. Agitador magnético.

7.6. Barras magnéticas recubiertas de teflón.

7.7. Vasos de Bohemia de 50 y 100 mL.

7.8. Matraz Erlenmeyer de 125 y 250 mL.

7.9. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL).

7.10. Pipeta automática calibrada de 1,0 mL.

7.11. Balanza de resolución 0,01 g.

7.12. Balanza de resolución 0,001 g.

8. REACTIVOS

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

8.2. Agua desairada para evitar posibles oxidaciones de reactivos incluidos en el Buffer antioxidante. Para desairar, calentar agua desionizada 8.1 a ebullición durante 15 minutos, enfriar y utilizar inmediatamente.

8.3. Buffer antioxidante de sulfuro: pesar 80 g de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), colocarlos en Erlenmeyer de 1000 mL, agregar 800 mL de agua desionizada y desairada, agitar hasta disolver y dejar enfriar. Agregar 35 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) y 67 g de EDTA disódica ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6), agitando para disolver, llevar a 1 L con agua desionizada y desairado. Esta solución será incolora o poseerá un leve color amarillo pálido, descartar cuando se torna marrón oscuro. Guardar inmediatamente en frasco hermético y sin cámara de aire para evitar oxidaciones. Se puede almacenar en frascos de 125 mL, que deben acompañar los envases de muestreo.

8.4. Solución estándar de perclorato de plomo [($Pb(ClO_4)_2$) Nro. CAS 13453-62-8] 0,100 M: Disolver 40,610 g de perclorato de plomo en agua y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Se puede utilizar la solución comercial Orion 948206.

8.5. Solución stock sulfuro aproximadamente 1300 mg/L: en un Erlenmeyer de 500 mL disolver 2,0 g de sulfuro de sodio nonahidratado ($Na_2S.9H_2O$ Nro. CAS 1313-84-4) en 250 mL de agua desionizada. Guardar en frasco de plástico con cierre hermético y a temperatura entre 0 y 5ºC. La validez de esta solución es de 6 meses.

8.6. Solución estándar de sulfuro aproximadamente 40 mg/L: en un Erlenmeyer de 200 mL colocar 5 mL de la solución stock de sulfuro (8.5), agregar 75 mL de buffer antioxidante, mezclar y llevar a 150 mL con agua desionizada. Determinar su concentración exacta por titulación potenciométrica con perclorato de plomo 0,0997 M, según procedimiento para determinación de sulfuro por titulación potenciométrico 4052UY.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. La solución interna del electrodo de referencia Ag+ /AgCl (Orion 9002) debe estar a 2,5 cm por encima de la solución externa del mismo electrodo. La solución externa debe estar a 2,5 cm por encima de la superficie de la muestra.

9.2. Los cambios de temperatura pueden provocar una deriva en el potencial medido por los electrodos. Dejar que la muestra alcance la temperatura ambiente previo a la determinación. Durante la calibración y la medida de las muestras se debe trabajar a una temperatura ambiente constante.

9.3. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Si esto sucede colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.

9.4. El electrodo responde lentamente por debajo de 1 mg S-2/L, en dicho caso dejar estabilizar la lectura de potencial 2 o 3 minutos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo.

10.1. Realizar el chequeo del electrodo, siempre que sea necesario: electrodo en desuso durante un tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.

10.2. Conectar el electrodo de plata/sulfuro y el electrodo de referencia (cuando corresponda) al analizador de iones, enjuagar ambos electrodos con agua desionizada y secar con papel absorbente.

10.3. Colocar en un vaso de bohemia 20,00 mL de agua desionizada y 20,00 mL del buffer antioxidante, agregar 400 µL de la solución estándar de sulfuro, mezclar suavemente con agitación magnética. Colocar los electrodos en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

10.4. Colocar a la solución anterior 4,00 mL de la misma solución estándar, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez se estabilice.

10.5. Si la temperatura de medida está entre 20 °C ± 5 °C, la diferencia de voltaje entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de -25 a -30 mV (verificar el rango para cada electrodo en el manual del instrumento). En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al manual de instrucciones del electrodo.

Nota 2: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí, en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 mg/L de S-2.

Nota 3: Es posible incluir el chequeo del electrodo dentro de la curva de calibración, tomando en cuenta dos puntos de curva con una diferencia de concentración en un factor de 10.

Curva de calibración.

10.6. La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución estándar de sulfuro (8.6) a una solución 1:1 de agua desionizada (8.1) y buffer antioxidante (8.3). Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración, para estimar los rangos de concentración en la que ésta debe ser preparada y evaluar si la muestra a analizar se encuentra dentro del rango de medida del método.

10.7. Colocar 40 mL de agua desionizada y 40 mL del buffer antioxidante en un vaso de Bohemia de 120 mL; registrar el peso de dicha solución.(Pi)

10.8. Sumergir los electrodos en la solución y mezclar mediante agitación magnética.

10.9. Agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de sulfuro, según el fin perseguido. Registrar el volumen agregado. Verificar que no se produzcan burbujas de aire que se interpongan entre la solución de medida y los sensores de los electrodos. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.

10.10. Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes de concentración exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como el potencial obtenido.

10.11. Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Pesar aproximadamente 30 gramos de la muestra en un vaso de bohemia de 100 mL, luego agregar una barra magnética y agitar suavemente. Sumergir los electrodos y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

11.2. Determinar la densidad y el peso total de la muestra, considerar que al momento del muestreo se agregan 125 mL de solución buffer antioxidante, lo cual debe de ser tomado en cuenta al momento de realizar los cálculos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Para crear la curva de calibración, graficar el potencial registrado en mV en función del logaritmo decimal de la concentración de sulfuro.

12.2. La concentración de sulfuro para cada punto de la curva de calibración se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Sulfuro, mg/L} = \frac{\text{V agregado x C estándar}}{\text{(V agregado + Pi/d)}}$$

donde:

V: agregado corresponde a la suma de todos los volúmenes agregado del estándar de sulfuro.

C: estándar corresponde a la concentración del estándar de sulfuro que se adiciona en mg/L.

Pi: corresponde al peso de la solución 1:1 de buffer y agua desionizada.

d: corresponde a la densidad en g/mL de la solución 1:1 de buffer y agua desionizada.

12.3. La curva de mejor ajuste al graficar el logaritmo decimal de la concentración de sulfuro en mg/L vs potencial en mV es una recta de la forma,

$$\text{Log (mg } S^{-2}\text{/L)} = a \times (mV) + b$$

Dónde: a y b: corresponden a los coeficientes de la recta.

12.4. Cuando la curva de mejor ajuste es una cuadrática:

$$\text{Log (mg } S^{-2}\text{/L)} = a \times (mV)_2 + b \times (mV) + c$$

Dónde: a, b y c: corresponden a los coeficientes de la recta

Dónde: a, b y c: corresponden a los coeficientes de la recta

12.5. La concentración de sulfuro en la muestra se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Sulfuro, mg } S^{-2}\text{/L} = 10EXP\ [a \times (mV) + b] \times Vf/(Vf-125)$$

o

$$\text{Sulfuro, mg } S^{-2}\text{/L} = 10EXP\ [a \times (mV)_2 + b \times (mV) + c\ ] \times Vf/(Vf-125)$$

Donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva

V: corresponde al potencial de la muestra en mV.

Vf: corresponde al volumen total de muestra (muestra + buffer)

125: corresponde al volumen de buffer utilizado para preservar la muestra.

12.6. En el caso de que la concentración de sulfuro en la muestra supere los 10 mg/L, es necesario realizar el análisis utilizando la técnica de Titulación Potenciométrica 4052UY.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de recuperación:** Se deben fortificar todas las muestras analizadas con una cantidad conocida de solución estándar de sulfuro (8.6) y verificar que el porcentaje de recuperación esté dentro de los límites establecidos por el gráfico de control correspondiente.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual sulfide ion electrode, silver ion electrode. Model 9416 BN Silver/Sulfide Half Cell, Model 9616 BNWP Sure-Flow TM Combination Silver/sulfide Electrodes. 1997.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Método 4500 S_2- A Sulfide Introduction y 4500 S2- G Ion selective electrode method pp. 509 a 511 y 515 a 517.

4052UY

Determinación de sulfuro en efluentes industriales en concentraciones superiores a 10 mg/L

Titulación potenciométrica

Elaborado - G. Medina

Modificado - C. Capeci

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de sulfuro en efluentes industriales, en concentraciones superiores a 10 mg/L (límite de cuantificación).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 118).

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 94, INE 16B)

2.7. Ruta de análisis (RIN 09)

2.8. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La determinación incluye todo el sulfuro presente como HS^-, H^2S y los sulfuros metálicos solubles, todos ellos son convertidos a S^{-2} con un buffer alcalino y antioxidante. El S^{-2} se determina por titulación potenciométrica con una solución estándar de perclorato de plomo, usando el electrodo selectivo de plata/sulfuro como indicador del punto final en la valoración.

3.2. El electrodo de plata/sulfuro consiste de una membrana de sulfuro de plata unida al cuerpo electródico. Cuando la membrana está en contacto con una solución conteniendo los iones plata o sulfuro, se produce una diferencia de potencial a través de la misma. Dicho potencial depende de la actividad de los iones en solución y es determinado contra un potencial de referencia. El buffer alcalino y antioxidante utilizado produce una fuerza iónica alta y constante, por lo cual la actividad del sulfuro es directamente proporcional a la concentración del ión en solución.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. El buffer alcalino y antioxidante contiene una elevada concentración de hidróxido de sodio (NaOH) es corrosivo, por lo cual no debe tomar contacto con la piel y los ojos.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los sulfuros de mercurio y plomo son insolubles en las condiciones de medida, por lo que no pueden ser determinados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un recipiente limpio de plástico (polietileno o equivalente) de 250 mL de capacidad el cual debe contener previamente 125 mL de buffer antioxidante.

6.2. Evitar que quede cámara de aire en el recipiente. Proteger de la luz. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). Analizar antes 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).

7.2. Electrodo selectivo de plata/sulfuro (Orion 9416).

7.3. Electrodo de referencia Ag+/AgCl (Orion 9002), con sus soluciones de relleno. Cámara interna Orion 900002, cámara externa Orion 900003.

7.4. Alternativamente a 7.2 y 7.3, puede ser utilizado un electrodo combinado Ag^{+}/S^{-2} (Orion 9616BNW) con su solución de relleno 900062

7.5. Agitador magnético.

7.6. Barras magnéticas recubiertas de teflón.

7.7. Vasos de Bohemia de 50 y 100 mL.

7.8. Balanza de resolución de 0,01 g.

7.9. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL).

7.10. Pipeta automática calibrada de 1,0 mL.

7.11. Balanza de resolución de 0,001 g.

8. REACTIVOS

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

8.2. Agua desairada para evitar posibles oxidaciones del ión sulfuro. Para desairar, calentar agua desionizada 8.1 a ebullición durante 15 minutos, enfriar y utilizar inmediatamente.

8.3. Buffer antioxidante de sulfuro: pesar 80 g de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2), colocarlos en Erlenmeyer de 1000 mL, agregar 800 mL de agua desionizada y desairada (8.2), agitar hasta disolver y dejar enfriar. Agregar 35 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ Nro. CAS 50-81-7) y 67 g de EDTA disódica ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) agitando para disolver, llevar a 1 L con agua desionizada y desairada. Esta solución deberá ser incolora o poseer un leve color amarillo pálido, descartar cuando se torna marrón oscuro. Guardar inmediatamente en frasco hermético y sin cámara de aire para evitar oxidaciones.

8.4. Solución estándar de perclorato de plomo [($Pb(ClO_4)_2$) Nro. CAS 13453-62-8] 0,100 M: disolver 40,610 g de perclorato de plomo en agua y llevar a 1000 mL en matraz aforado. Alternativamente puede utilizarse la solución comercial Orion 948206.

8.5. Solución stock sulfuro aproximadamente 1300 mg/L: en un Erlenmeyer de 250 mL disolver 25 g de sulfuro de sodio nonahidratado ($Na_2S.9H_2O$ Nro. CAS 1313-84-4) en 250 mL de agua desionizada y desairada. Guardar en frasco de plástico con cierre hermético y sin cámara de aire.

8.6. Solución estándar de sulfuro de aproximadamente 40 mg/L para chequeo del electrodo: en Erlenmeyer de 200 mL colocar 5 mL de la solución stock de sulfuro, agregar 75 mL de buffer antioxidante, mezclar y llevar a 150 mL con agua desionizada y desairada. Para el chequeo del electrodo no se requiere conocer exactamente la concentración del estándar de sulfuro.

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. La solución interna del electrodo de referencia debe estar a 2,5 cm por encima de la solución externa del mismo electrodo. La solución externa debe estar a 2,5 cm por encima de la superficie de la muestra.

9.2. Los cambios de temperatura pueden provocar una deriva en el potencial medido por los electrodos. Dejar que la muestra alcance la temperatura ambiente previo a la determinación.

9.3. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución de medida. Si esto sucede colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

10.1. Realizarlo siempre que sea necesario, electrodo en desuso durante un tiempo prolongado, medidas erráticas, slope fuera de los límites de aceptación.

10.2. Colocar en un vaso de Bohemia 20,00 mL de agua desionizada y 20,00 mL del buffer antioxidante, agregar 400 µL de la solución estándar de sulfuro, mezclar suavemente con agitación magnética. Colocar el (los) electrodo(s) en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida.

10.3. Colocar a la solución anterior 4,00 mL de la misma solución estándar, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez estable la medida.

10.4. Si la temperatura de medida está entre 20 °C ± 5 °C, la diferencia de voltaje entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de -25 a -30 mV (verificar el rango para cada electrodo en el manual del instrumento). En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al Manual de instrucciones del electrodo.

Nota 2: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí, en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 ppm de S-2.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Previo al análisis de la muestra registrar el volumen total, muestra + 125 mL de buffer (Vf).

11.2. Realizar una toma en peso de aproximadamente 40 mL de la muestra a titular, colocar en vaso de Bohemia. Sumergir el (los) electrodo(s) en la muestra y agitar suavemente.

11.3. Agregar con una pipeta automática de 10-100 µL la solución de perclorato de plomo en incrementos de 0,05 - 0,1 mL. Registrar el voltaje luego de cada adición. Cuando el cambio en el potencial por volumen de titulante agregado, comienza a aumentar, pasar a agregar el mismo en incrementos de 0,02 mL y continuar hasta 0,1 mL después del punto final. El punto final de la valoración está dado por un salto de potencial entre 40 y 100 mV.

11.4. Graficar el cambio de potencial en función del promedio del volumen antes y después de cada adición del titulante. El gasto de perclorato (G) se determina exactamente a partir de dicha curva como el volumen que provoca mayor variación de potencial.

11.5. Determinar la densidad de la muestra (d) pesando exactamente 1,0 mL de la misma utilizando para la toma una pipeta calibrada.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La concentración de sulfuro en la muestra corresponde a:

$$S^{-2}, mg/L = \frac{M \times G \times 32060 \times d}{V \times (Vf-125)} \times Vf$$

donde:

M: corresponde a la molaridad de la solución de perclorato de plomo titulante en moles/L.

G: corresponde al gasto de titulante en mL.

V: corresponde a la toma de muestra utilizada en la determinación en g.

Vf: corresponde al volumen total de muestra (muestra + buffer).

125: corresponde al volumen total de buffer usado para preservar la muestra.

d: corresponde a la densidad de la muestra en g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado de todas las muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites establecidos por el gráfico de control correspondiente. En caso contrario repetir el análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ORION RESEARCH INCORPORATED. Instruction Manual sulfide ion electrode, silver ion electrode. 1980. Model 9416 Silver/Sulfide Half Cell, Model 9616 Sure-Flow TM Combination Silver/Sulfide Electrodes.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Método 4500 S2- A Sulfide Introduction y 4500 S2- G Ion-selective electrode method, pp. 509 a 511 y 515 a 517.

4077UY

Determinación de fluoruro en aguas naturales y efluentes industriales líquidos

Método potenciométrico

Elaborado - N. Barboza

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para determinación de fluoruro en aguas naturales y efluentes industriales líquidos. El límite de detección de la metodología es de 0,04 mg/L y se puede determinar fluoruro cuantitativamente a partir de 0,1 mg/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso de analizador de iones (INE 118)

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06)

2.7. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.8. Ruta de análisis código (RIN 23)

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA - Ministerio de Ambiente (ES01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El electrodo selectivo de fluoruro está compuesto por un módulo sensor contenido dentro de un cuerpo epoxi. Cuando el elemento sensor se encuentra en contacto con una solución conteniendo iones fluoruro, se genera un potencial que depende de la actividad de dicho fluoruro en solución. Dicho potencial es medido contra un potencial de referencia interno con un pH/mV meter.

3.2. El electrodo mide la actividad del ion fluoruro que se define como:

$$A = \gamma C$$

donde:

A: corresponde a la actividad del ión fluoruro

γ: corresponde al coeficiente de actividad

C: corresponde a la concentración de los iones fluoruro libres en solución.

La actividad del ion fluoruro depende de la fuerza iónica total, del pH y de las especies generadoras de complejos presentes. Agregando un buffer apropiado se provee una fuerza iónica alta y constante y así la actividad es directamente proporcional a la concentración del ión fluoruro.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1.

Sustancia	Conc. mg/L	Tipo de error
Alcalinidad ($CaCO_3$)	7000	+
Aluminio (Al^{+3})	3,0	-
Cloruro (Cl^-)	20000	nd
Cloro	5000	nd
Hierro	200	-
Hexametafosfato $(NaPO_3)_6$	50000	nd
Fosfato (PO_4^{3-})	50000	nd
Sulfato (SO_4^{2-})	50000	-

(+) indica error positivo (-) indica error negativo (nd) indica error no medid

Es importante asegurar que el pH de la solución de la muestra con el buffer presenta un pH entre 5 y 6, de lo contrario ajustar el pH de la muestra previo al agregado de la solución reguladora de fuerza iónica. Esto se debe a que en soluciones con pH < 5, se forman complejos HF y/o HF^{2-}, los cuales no pueden ser detectados por el electrodo y en soluciones básicas con baja cantidad de fluoruro, el ion OH^- es medido como F^-.

Nota 1: No pueden utilizarse ni bases ni ácidos fuertes para ajustar el pH. Puede utilizarse ácido acético o acetato de sodio 4 M para para el ajuste.

Nota 2: En muestras con contenido de cloruro > 2000 mg/L se requerirá de una destilación previa.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio, plástico (polietileno o equivalente) o bolsa de polietileno para muestras liquidas descartable. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C) y analizar tan pronto como sea posible. Máximo 28 días. Para este análisis son necesarios 200 mL de muestra. En muestras con contenido de cloruro > 2000 mg/L se requiere destilación previa.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Analizador de iones (Orion VersaStar Pro).

7.2. Electrodo combinado selectivo de fluoruro (Orion 96-09) con solución interna de relleno Orion 900061.

7.3. Agitador magnético.

7.4. Barras magnéticas recubiertas de teflón.

7.5. Vaso de Bohemia de 125 mL, de 250 mL o matraz Erlenmeyer de 125 mL.

7.6. Pipetas automáticas de volúmenes variables (10 - 100 µL y de 100-1000 µL).

7.7. Balanza de resolución 0,01 g

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).

8.2. Solución stock de fluoruro: pesar 221,0 mg de fluoruro de sodio anhidro, (NaF Nro. CAS 7681-049-4) secado en estufa a 105 °C ± 2 °C hasta peso constante. Disolver en 1000 mL de agua 8.1; 1,00 mL corresponde a 100 µg F^- (100 mg/L). Esta solución es estable por 6 meses. Alternativamente utilizar una solución comercial de 100 mg de F/L (Orion 940907 o similar).

8.3. Solución estándar de fluoruro: diluir 100 mL de solución stock de fluoruro, hasta 1000 mL con agua destilada, 1,00 mL corresponde a 10 µg F^- (10 mg/L).

8.4. Solución reguladora de fuerza iónica (solución de interferencias): se colocan aproximadamente 500 mL de agua 8.1 en un matraz de 1 L. Agregar 57 mL de ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$ Nro. CAS 64-19-7), 58 g de cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5) PA y 4,0 g de ácido 1,2 ciclohexilenediaminotetracetico (CDTA $C_{14}H_{22}N_2O_8$ Nro. CAS 482-54-2). Agitar para disolver. Colocar un electrodo de pH calibrado en la solución, lentamente se agrega hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS1310-73-2), 5 N (aproximadamente 120 mL) hasta ajustar el pH entre 5,3 y 5,5. Enfriar hasta temperatura ambiente. Llevar el volumen del matraz a 1 L con agua 8.1.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice (ES01).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El tiempo requerido para alcanzar el 99 % de la estabilidad de la lectura puede variar desde algunos segundos en soluciones concentradas, hasta varios minutos si la concentración está cerca del límite de detección.

9.2. El electrodo de fluoruro debe sumergirse unos 2 cm en la solución y realizar todas las determinaciones de la misma manera, para así evitar medidas erráticas.

9.3. Trabajar a la misma temperatura durante la calibración y la medida de las muestras. Los agitadores magnéticos pueden generar calor suficiente como para cambiar la temperatura de la solución a medir. Si esto sucede, colocar un trozo de material aislante entre el agitador y el recipiente de medida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Chequeo del electrodo:

10.1. Agregar solución de relleno cada vez, antes de usar el electrodo.

10.2. El chequeo del electrodo debe realizarse siempre que sea necesario: electrodo en desuso por tiempo prolongado, medidas erráticas. Consultar el manual del electrodo.

10.3. Conectar el electrodo de fluoruro al analizador de iones, enjuagar con agua destilada y secar con papel absorbente.

10.4. Colocar en un vaso de 100 mL de Bohemia 20,00 mL de agua destilada libre de fluoruro y 20,00 mL de solución reguladora de fuerza iónica. Agregar 1 mL de la solución estándar de 100 mg/L, mezclar suavemente con agitación magnética. Colocar el electrodo en la muestra y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida, la estabilización puede requerir hasta 5 minutos.

10.5. Agregar a la solución anterior 10,00 mL de la misma solución estándar, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez que la medida se haya estabilizado.

10.6. Si la temperatura de medida está entre 25 °C ± 5 °C, la diferencia de voltaje (slope) entre ambos agregados se debe encontrar en el rango de - 54 a - 60 mV. En caso contrario repetir la operación, si el error persiste referirse al “Manual de instrucciones del electrodo”.

Nota 4: Se puede utilizar otra concentración de estándar para el chequeo del electrodo, pero las concentraciones finales de ambos agregados deben diferir entre sí en un factor de 10 y estar ambas concentraciones por encima de 1 mg/L.

Curva de calibración:

10.7. La curva de calibración se prepara por agregados sucesivos de la solución stock o de la solución estándar de fluoruro, a una solución 1:1 de agua destilada y solución reguladora de fuerza iónica. Se recomienda medir el voltaje de las muestras previo a la preparación de la curva de calibración para estimar el rango de la misma.

10.8. Colocar 40 mL de agua y 40 mL de la solución reguladora de fuerza iónica en un vaso de Bohemia de 120 mL, registrar el peso de dicha solución, (Pi). Se pueden agregar otros volúmenes, manteniendo la relación 1:1 agua-solución de interferencias.

10.9. Sumergir el electrodo en la solución y mezclar suavemente mediante agitación magnética.

10.10. Agregar con pipeta automática un volumen adecuado de la solución estándar de 100 o 10 mg/L de fluoruro, según el fin perseguido. Registrar en la ruta de análisis correspondiente el volumen agregado. Verificar que no se produzcan burbujas de aire que se interpongan entre la solución de medida y el sensor del electrodo. Medir el voltaje cuando se estabilice la medida.

10.11. Repetir el paso anterior, agregando a la solución de medida otros volúmenes exactamente conocidos de la solución estándar y medir el voltaje. Registrar tanto los incrementos de volumen como los potenciales obtenidos.

10.12. Los incrementos de volumen deberán ser evaluados por el analista con el fin de cubrir el rango de concentraciones de la muestra. La curva de calibración debe contener al menos cinco puntos.

10.13. Es recomendable verificar la calibración cada 2 horas colocando el electrodo en una alícuota nueva del estándar utilizado para la calibración. Si la medida cambia, recalibrar.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Colocar 30 mL de la muestra (Pm) o una dilución apropiada de la misma y 30 mL de la solución reguladora de fuerza iónica (Pf) en un vaso de Bohemia o Erlenmeyer. Sumergir el electrodo, agitar suavemente y registrar el voltaje una vez que se haya estabilizado la medida. La toma de la muestra y de la solución reguladora de fuerza iónica debe realizarse en peso con una precisión de al menos 0,01 g. Se pueden agregar otros volúmenes, manteniendo la relación 1:1 agua - solución reguladora de fuerza iónica.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La concentración de fluoruro para cada punto de la curva de calibración se calcula:

$$\text{Fluoruro mg/L} = \frac{V_{\text{agregado}} \times C_{\text{estándar}}}{(V_{\text{agregado}} + V_{\text{inicial}})}$$

donde:

Vagregado: corresponde a la suma de los volúmenes agregados de estándar

Vinicial: corresponde a Pi (se considera la densidad de solución acuosa 1,0 g/mL)

Cestándar: corresponde a la concentración del estándar que se adiciona en mg F /L.

12.2. Graficar el logaritmo decimal de la concentración de fluoruro, en función al opuesto del potencial registrado en mV (-mV).

12.3. Para concentraciones de fluoruro menores a 1 mg/L la curva de calibración que mejor se ajusta es una cuadrática. A concentraciones mayores la curva de calibración que mejor se ajusta, es una recta.

Curva de calibración cuadrática: log (mg F/L) = a x (-mV)2 + b (-mV) + c

Curva de calibración lineal: log (mg F/L) = a x (-mV) + b

donde:

a, b y c: corresponden a los coeficientes de ajuste de las curvas.

12.4. La concentración de fluoruro se calcula según la ecuación correspondiente:

Rango cuadrático: **Fluoruro, mg F/L** = 10EXP [a x (-mV)2 + b x (-mV) + c] x Pf/Pm

Rango Lineal **Fluoruro, mg F/L** = 10EXP [(a x (-mV) + b] x Pf /Pm

donde:

mV: corresponde al potencial de la muestra.

Pf. corresponde al peso final de muestra + solución de interferencias (+ agua, en caso de dilución) en g. Se asume densidad de la muestra 1 g/mL.

Pm: corresponde al peso de muestra en g. Se asume densidad de la muestra 1 g/Ml

a, b y c: corresponden a los coeficientes de la curva de calibración en cada caso.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud:** Analizar la solución de “Control de Fluoruro” (elaborada por el sector Control de Calidad) simultáneamente con las muestras. Se puede utilizar como control otra solución de concentración conocida, preparada independientemente de la utilizada en la curva de calibración. Se compara el resultado con el gráfico de control correspondiente; en su defecto utilizar el criterio de aceptación de 90 a 110 %.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

13.2. **Control de la precisión:** Se debe realizar un análisis por duplicado cada cinco muestras, mínimo uno por batch de muestras. Se aceptará una dispersión máxima de 10 % (RSD), de lo contrario deberá repetirse el análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Método 4500 – F- C Ion selective electrode method pp. 398 a 400.

14.2. Manual del electrodo. Fluoride Combination electrode. Instruction Manual. Orion, Model 94-09 y 96-09.

4081UY

Determinación de amonio mediante utilización de kits en aguas naturales y efluentes industriales

Elaborado - J. Martínez, V. Croce

Modificado - J. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de amonio en aguas naturales (subterráneas y superficiales) y en efluentes industriales. En el caso de muestras de agua salobre (salinidad >0,5‰), no es posible usar el kit de bajas concentración.

1.2. El límite de detección es 0,015 mg N/L y el límite de cuantificación 0,044 mg N/L.

1.3. El rango de trabajo queda definido entre el límite de cuantificación y 8000 mg N/L (obtenido por dilución máxima validada 1/100).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 94 e INE 115)

2.6. Instructivo de uso del equipo de destilación (INE 136)

2.7. Instructivo de uso de prensa para tubos de destilación (INE 137)

2.8. Ruta de análisis (RFQ 53 y 54)

2.9. Instructivos de uso de destilador y desionizador de agua (INE 82, INE 109, INE 121)

2.10. Instructivos de kits 1.14739 y 1.14559

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El nitrógeno en forma de amonio (NH_4-N) se presenta en parte en forma de iones amonio y en parte en forma de amoníaco. Entre ambas formas de aparición existe un equilibrio dependiente del pH. En solución fuertemente alcalina, en la que prácticamente sólo existe amoníaco, tiene lugar con iones hipoclorito una transformación en monocloramina. Esta forma con un fenol substituido, un derivado azul de indofenol que se determina fotométricamente. Debido a la tinción propia de color amarillo del valor en blanco de los reactivos, la solución de medición aparece en color amarillo-verde a verde.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada. ¡Tener en cuenta las advertencias de peligro que se encuentran en los diferentes componentes del envase!

4.3. Precaución: los tubos de reacción contienen fenol. Se debe mantener buena ventilación para minimizar la exposición del personal a esta sustancia.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El proveedor del kit evaluó la influencia de sustancias extrañas. No se han controlado efectos cumulativos; sin embargo, éstos no pueden ser excluidos.

Concentraciones de sustancias extrañas en mg/l o %					
Al^{3+}	500	Mn^{2+}	5	EDTA	500
Ca^{2+}	250	Ni^{2+}	10	Aminas primarias[1)]	0
Cd^{2+}	100	NO_2^-	500	Aminas secundarias[2)]	2
CN^-	10	PB^{2+}	500	Aminofenoles	5
Cr^{3+}	5	PO_4^{3-}	100	Anilina	10
$CR_2O_7^{2-}$	100	S^{2-}	1	Trietanolamina	500
Cu^{2+}	10	SiO_3^{2-}	500	Surfractantes[3)]	500
F^-	500	Zn^{2+}	10	Na-acetato	5%
Fe^{3+}	10			NaCl	5%
Hg^{2+}	10			$NaNO_3$	5%
Mg^{2+}	25			Na_2SO_4	5%

Los agentes reductores interfieren en la determinación:

1) probado con metilamina.

2) probado con dimetilamina.

3) probado con tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar al menos 250 mL de muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y refrigerar ≤ 6 °C (> 0 °C). Las muestras de agua natural y aquellos efluentes que no requieren destilación previa a la determinación deben ser filtradas por filtro de 0,45 µm de tamaño de poro.

6.2. Realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo.

6.3. De no ser posible congelar la muestra a -20 °C y analizarla antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,001 g.

7.2. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 - 10,00) mL, (20 – 100) µL y (100 – 1000) µL.

7.3. Matraces Erlenmeyer de 150 ó 250 mL.

7.4. Equipo de destilación de muestras (LACHAT Micro Dist o similar)

7.5. Tubos de destilación.

7.6. Prensa para tubos de destilación.

7.7. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL o 1000 mL.

7.8. Bomba de vacío.

7.9. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro.

7.10. Espectrofotómetro para realización de lecturas a 710nm.

8. REACTIVOS

8.1. Kit determinación de amonio Merck 1.14739 (o similar) para bajas concentraciones en el rango 0,010-2,000 mg N/L.

8.2. Kit determinación de amonio Merck 1.14559 (o similar) para altas concentraciones en el rango 4,0-80,0 mg N/L.

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

8.4. Material de referencia certificado, de concentración 1000 mg NH_4/L (776,42 mg N/L) para curva de calibración. En caso de no contar con MRC, es posible prepararla según Manual de Control de Calidad Analítico, debiendo ser independiente a la solución 8.5.

8.5. Solución control para chequeo de exactitud de 200mgN/L (de origen totalmente independiente del 8.4). (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9) en un matraz aforado de 500 mL disolver 0,3819 g de cloruro de amonio que es previamente secado en estufa durante 2 horas a 110 °C en aproximadamente 400 mL de agua Diluir hasta el aforo el invertir para mezclar. Es posible utilizar un MRC vigente independiente al utilizado para la preparación de la curva de calibración.

8.6. Solución control de 1 mgN/L: preparar a partir de solución 8.5, realizando dos diluciones seriadas 1/10 y 1/20.

8.7. Solución control de 10 mgN/L: preparar a partir de solución 8.5, realizando una dilución de 1/20.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Enjuagar el material de vidrio con agua destilada hasta ausencia de amonio.

9.2. Al usar por primera vez substituir la tapa roscada del frasco de reactivo NH4-1K por el dosificador azul. Mantener verticalmente el frasco de reactivo y en cada dosificación apretar el cursor en el dosificador hasta el tope. Antes de cada dosificación poner cuidado en que el cursor esté completamente sacado.

9.3. Acabada la serie de mediciones, cerrar el frasco de reactivo, ya que la absorción de humedad del aire perjudica el funcionamiento del reactivo.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. **Curva de calibración:** Realizar una curva de calibración de por lo menos 5 diluciones del estándar para cada kit. Es posible utilizar una curva preparada con anterioridad siempre y cuando se haya definido la vigencia máxima en etapa de validación de la técnica.

10.2. Blancos: el blanco de reacción se realiza con agua desionizada. Se prepara uno para cada kit. Estos se utilizan para “cerar” el equipo y se trata como al resto de las muestras.

Para curva de bajas concentraciones (0,010-2,000 mg N/L)

10.3. Preparar una solución intermedia de 0,77642 mg N/L a partir de la solución de amonio de 776,42 mg N/L para la curva de calibración, tomando 0,1 mL del MRC y agregando agua desionizada hasta alcanzar 100 mL. Realizar tomas de 0,644 y 6,440 mL de la solución intermedia y completar con agua desionizada hasta 50 mL. Estas soluciones corresponden a 0,01 y 0,1 mg N/L respectivamente. A su vez, realizar tomas de 0,032, 0,064 y 0,129 mL de la solución de amonio de 776,42 mg N/L y completar con agua desionizada hasta 50 mL. Estas soluciones corresponden a 0,5, 1 y 2 mg N/L.

10.4. Pipetear 5 mL de la solución y agregarla al tubo de reacción del kit. Cerrar el tubo y mezclar. Luego, utilizando el dosificador del kit, agregar una dosis del reactivo NH_4-1K y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente. Dejar en reposo 15 minutos y medir absorbancia a 710 nm.

Para curva de altas concentraciones (4,0-80,0 mg N/L)

10.5. Realizar tomas de 0,258, 0,644, 1,288, 2,576 y 5,152 mL de la solución de amonio de 776,42 mg N/L para la curva de calibración y luego completar un volumen final de 50 mL con agua desionizada. Estas soluciones corresponden a 4, 10, 20, 40 y 80 mg N/L.

10.6. Pipetear 0,10 mL de la solución y agregarla al tubo de reacción del kit. Cerrar el tubo y mezclar. Luego, utilizando el dosificador del kit, agregar una dosis del reactivo NH_4-1K y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente. Dejar en reposo 15 minutos y medir absorbancia a 710 nm.

Para determinaciones empleando una u otra curva

10.7. Registrar los datos obtenidos en RFQ 53 luego de la determinación.

10.8. En ambos casos graficar Absorbancia en función de la concentración.

10.9. En caso de que la marca del kit y del espectrofotómetro utilizado coincida, normalmente este último tiene precargada la curva de calibración, para cuyo caso no es necesaria la preparación de la misma. En caso contrario, realizar curva de calibración.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Para kit de bajas concentraciones: agitar y pipetear 5 mL de la muestra y agregarla al tubo de reacción del kit. Cerrar el tubo y mezclar. Luego, utilizando el dosificador del kit, agregar una dosis del reactivo NH_4-1K y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente. Dejar en reposo 15 minutos y medir absorbancia a 710 nm.

11.2. Para kit de altas concentraciones: agitar y pipetear 0,10 mL de la muestra y agregarla al tubo de reacción del kit. Cerrar el tubo y mezclar. Luego, utilizando el dosificador del kit, agregar una dosis del reactivo NH_4-1K y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente. Dejar en reposo 15 minutos y medir absorbancia a 710 nm.

11.3. Registrar los datos obtenidos en RFQ 54 luego de la determinación.

Nota 1: Para el caso de efluentes, en caso de que el resultado final de la muestra sea de 5 mg NH_4 - N/L ± 20% se debe repetir dicha muestra realizando una destilación previa como se especifica en los instructivos INE 136 e INE 137.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Las curvas de calibración de ambos kits están representadas por la siguiente curva lineal:

$$Abs = a \times (mg\ N/L) + b$$

donde:

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

La concentración de amonio se calcula según la siguiente ecuación:

$$NH_4(mg\ N/L) = (Abs - b)/a \times FD$$

donde:

FD corresponde al factor de dilución de la muestra.

Los resultados se expresan en mg N/L.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Curva de calibración:** para esta técnica, la curva de calibración debe ser realizada cada 45 días, en ambos rangos, en caso de que los kits que se empleen no sean de la misma marca del espectrofotómetro que se utilice, por lo que la misma no esté precargada con anterioridad en el equipo.

13.2. **Control de la exactitud:** analizar la solución control simultáneamente con las muestras. Cuando se utiliza el kit de bajas, utilizar la solución control de 1mgN/L y el caso de curva de altas, la solución control de 10mgN/L. Se aceptara una recuperación entre 80-120% hasta contar con gráficos de control. En caso de no cumplimiento, consultar en el Manual de Control de Calidad Analitico.

13.3. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada 5 muestras de aguas y uno cada 3 muestras de efluentes, o al menos uno por serie de muestras Se aceptará hasta 10% de rango normalizado hasta no contar con el gráfico de control correspondiente.

13.4. **Porcentaje de recuperación:** Se realizarán fortificaciones (con la solución control) en todas las muestras de efluentes industriales y en aquellas otras muestras que se sospeche interferencia de la matriz.

Para el kit de bajas concentraciones tomar aproximadamente 30 g de muestra y fortificar con 0,10 mL de una dilución de material de referencia o de la solución preparada según el punto 8.5.

Para el kit de altas concentraciones tomar aproximadamente 20 g de muestra y fortificar con 0.1 mL de la solución preparada según el punto 8.5.

Se aceptará una recuperación entre 80-120% del fortificado hasta no contar con gráficos de recuperación de la fortificación. En el caso de efluentes, cuando el porcentaje de recuperación de la adición, no se encuentre dentro de los límites de control y/o el valor a reportar este en el entorno de 5mgN/L ± 20%, se deberá repetir el análisis con destilación previa.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Nitrogen (Ammonia) 4500-NH3 A Introduction, F Phenate Method. pp. 424 a 433.

14.2. ISO 23695 Determination of ammonium nitrogen in water — Small-scale sealed tube method (Análogo a EPA 350.1, APHA 4500-NH3 F, ISO 7150-1 y DIN 38406-5.)

14.3. U.S. Environmental Protection Agency. In: Ohrel RL, Register KM, eds. Volunteer Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual, 2nd ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; 2006. Chapter 14: Salinity. EPA-842-B-06-003. pp. 14-1 a 14-8.

4085UY

Determinación de nitrato en aguas y efluentes. Reducción por cadmio.

Flow Injection Analysis (FIA)

Elaborado - E. Rodó

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrato (NO_3) en aguas naturales incluyendo muestras de agua salobre (salinidad >0,5‰), así como en aguas residuales domésticas e industriales. Mediante este procedimiento se puede determinar la concentración de nitrato en un rango de 0,06 - 20 mg N/L. Puede ampliarse el valor superior, por diluciones de la muestra. El límite inferior puede verse afectado por interferencias de la matriz. El límite de detección 0,020 mg NO_3 N/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. 4087 UY Determinación de la concentración de nitrito en aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales.

2.6. Instructivo de uso balanzas (INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 115).

2.7. Instructivo de uso del FIA (INE 78).

2.8. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua(INE 82, INE 109, INE 121).

2.9. Ruta de análisis de nitrato y nitrito (RIN 33).

2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El nitrato es reducido a nitrito (NO_2) al pasar la muestra a través de una columna de cadmio cooperizado. El nitrito (nitrato reducido más nitrito original) es determinado mediante la formación de un compuesto azo de color rojo por la reacción con sulfanilamidadiazotada y N- (1-naftil)- etilendiaminadihidrocloro (NED dihidrocloro). El compuesto formado, altamente coloreado, es medido espectrofotométricamente a 520 nm de longitud de onda.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección para la preparación de reactivos.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El cloro residual puede interferir oxidando el poder reductor de la columna.

5.2. Pueden obtenerse bajos resultados con muestras que presenten altas concentraciones de hierro, cobre u otros metales. En el presente método, EDTA es añadido al buffer de forma de reducir este tipo de interferencia.

5.3. Altas concentraciones de grasas y aceites podrían cubrir la superficie de cadmio, esta interferencia puede eliminarse realizando una pre-extracción de la muestra utilizando un solvente orgánico.

5.4. La turbidez puede interferir, pero esta puede ser removida filtrando la muestra a través de un filtro de membrana de 0,45 µm previo del análisis.

5.5. Muestras con alto contenido de cloruro de mercurio pueden interferir en el correcto desempeño de la columna de cadmio.

5.6. La muestra deberá presentar un pH entre 7 y 9, en caso contrario, deberá ajustarse con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) según corresponda.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Se requiere al menos 250mL de muestra para realizar el análisis.

6.2. Para contar con el dato de nitrato independiente al de nitrito, es necesario realizar el análisis antes de las 48 horas de recolectada la muestra.

6.3. Para Nitrato+Nitrito (combinado): si la muestra no va a ser analizada dentro de las 48 horas de recolectada, acidificarla hasta pH < 2 con 2mL de ácido sulfúrico concentrado por litro de muestra, refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C) y analizarla dentro de un periodo de 28 días. En este caso no se podrá determinar nitrato y nitrito como especies individuales.

6.4. Las muestras deben ser pre-filtradas con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro si la concentración de los sólidos suspendidos pudiera afectar el flujo en la columna de cadmio. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin filtración previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de manifold para la determinación de nitrato y nitrito (LACHAT QuickChem 8500 o similar)

7.2. Balanza de resolución 0,01 g para preparación de reactivos

7.3. Balanza de resolución de 0,001 g para toma de muestra y estándares

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de 1,00 a 10,00mL

7.5. Matraces aforados de 1000mL

7.6. Matraces Erlenmeyer de capacidad entre 50 y 150mL

7.7. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de capacidad 250mL o 1000mL

7.8. Bomba de vacío

7.9. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Buffer de cloruro de amonio: En un recipiente de 1L de capacidad, agregar 800mL de agua desionizada, 107mL de ácido clorhídrico concentrado (Nro. CAS 7647-01-0), 62mL de NH_4OH (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6) y 1.0 g de EDTA disódicodihidratado ($Na_2EDTA\text{-}2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6). Agitar hasta disolver. El pH de este buffer debe ser 8.5. (Ajustar el pH a 8.5 con NH_4OH o HCl concentrado).

8.3. Reactivo colorante: Tarar un recipiente ámbar de 1 L de capacidad, agregar 850mL de agua desionizada, 100mL de H_3PO_4 al 85% (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2), 40.0 g de sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$ Nro. CAS 63-74-1) y 1.0 g de N-(1 naftil)- etilendiaminadiclorhidrato (NED) (NED Nro. CAS 1465-25-4). Agitar con agitador magnético durante 30 minutos hasta disolver. Llevar a 1L con agua desionizada. Esta solución es estable durante un mes. Descartar la solución si está muy coloreada u oscura.

8.4. Solución stock de nitrato (200 mg N/L): En un matraz aforado de 1L de capacidad, disolver 1.444 g ± 0.0005 g de KNO_3 (KNO_3 Nro. CAS 7757-79-1) en aproximadamente 600mL de agua desionizada. Agregar 2mL de cloroformo ($CHCl_3$ Nro. CAS 67-66-3). Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar. Esta solución es estable durante 6 meses.

8.5. Solución control de nitrato (200 mg N/L): En un matraz aforado de 1L de capacidad, disolver 1.444 g ± 0.0005 g de KNO_3 (KNO_3 Nro. CAS 7757-79-1) en aproximadamente 600mL de agua desionizada. Agregar 2mL de cloroformo ($CHCl_3$ Nro. CAS 67-66-3). Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar. Esta solución es estable durante 6 meses.

8.6. Solución stock de nitrito (200mgN/L): En un matraz aforado de 1L de capacidad, disolver 0,986 g ± 0,0005 g de $NaNO_2$ ($NaNO_2$ Nro. CAS7632-00-0) o 1,214 g ± 0,0005 g de KNO_2 (KNO_2 Nro. CAS 7758-09-0) en aproximadamente 800mL de agua desionizada. Agregar 2mL de cloroformo. Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar. Refrigerar. De acuerdo a 4087 UY

8.7. Solución control de nitrito (200mgN/L): En un matraz aforado de 1 L de capacidad, disolver 0,986 g ± 0,0005 g de $NaNO_2$ ($NaNO_2$ Nro. CAS 7632-00-0) o 1,214 g ± 0,0005 g de KNO_2 (KNO_2 Nro. CAS 7758-09-0) en aproximadamente 800mL de agua desionizada. Agregar 2mL de cloroformo. Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar. Refrigerar.

Nota 1: Los reactivos utilizados para preparar tanto la solución stock como la solución control deben ser de marcas distintas o al menos número de lotes distintos.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Para el cuidado de la columna de cadmio, se aconseja que para las muestras a analizar correspondientes a las matrices de aguas residuales doméstico e industriales, se les realice una dilución aproximada de 10.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de estándares de acuerdo al siguiente cuadro utilizando una balanza con resolución de 0,001 g, a partir de un estándar de aproximadamente 200mgN/L, preparado a partir de material de referencia certificado o de la solución del apartado 8.4.

Masa Std (g)	Masa final (g)	Concentración aprox. final (mgN/L)
5,0	50	20
1,25	50	5,0
0,250	50	1,0
0,125	50	0,5
0,0625	50	0,25
0,0313	50	0,125
0,0150	50	0,060

En cada corrida, preparar al menos 5 puntos de curva incluyendo el blanco.

10.2. Preparar una solución control de nitrato para el chequeo de la curva de calibración a partir de un estándar de aproximadamente 200mgN/L preparado a partir de material de referencia certificado o de la solución 8.5, de acuerdo al siguiente cuadro:

Concentración Std (mgN/L)	Masa solución control (g)	Masa final (g)	Concentración aprox. final (mgN/L)
200	0,25	50	1,0

10.3. Preparar una solución control de nitrito para el chequeo de la columna de cadmio a partir de un estándar de aproximadamente 200mgN/L preparado a partir de material de referencia certificado o de la solución 8.7, de acuerdo al siguiente cuadro:

Concentración Std (mgN/L)	Masa solución control (g)	Masa final (g)	Concentración aprox. final (mgN/L)
200	0,25	50	1,0

Nota 2: Se asume densidad de las muestras 1 g/mL.

Nota 3: Los reactivos y estándares deben estar a temperatura ambiente previo a su utilización en el equipo de FIA.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Para efluentes se sugiere realizar una dilución previa de al menos 10 veces aproximadamente. Registrar la toma de muestra y la masa final de la dilución en RIN 33. Las muestras de agua se analizan sin dilución previa.

11.2. Encender el equipo de inyección en flujo.

11.3. Verificar que la columna esté fuera de línea, colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua desionizada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

11.4. Colocar uno a uno en el orden que aparece en el Manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar por unos 10 minutos. Abrir la válvula de la columna de manera que se encuentre en línea y dejar circulando los reactivos hasta que se encuentre una línea de base estable.

11.5. Realizar una alícuota de las muestras a analizar y colocarlas en los tubos del rack del autosampler, después de haber colocado los estándares de la curva de calibración (menor a mayor concentración), blanco (solo agua desionizada) y controles.

11.6. Verificar en el programa que este seteado correctamente el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.

11.7. Ingresar en el programa del sistema la secuencia de análisis deseada con los valores de concentración de los estándares, controles de nitrato y nitrito para el control de la columna de cadmio y muestras.

11.8. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

11.9. Si no se va a analizar otra corrida de análisis, cambiar la posición de la válvula de manera que la columna esté fuera de línea, colocar todas las líneas de reactivos en agua desionizada y dejar circular durante 15 a 30 minutos. Por último, quitar todas las líneas del agua y dejar la bomba encendida para que circule aire durante 15 a 30 minutos de manera de secar las líneas del Manifold.

11.10. Apagar todo el equipo y distender los tubos que pasan por la bomba.

11.11. Si se desea determinar únicamente el valor de nitrato de las muestras correr la misma serie de muestras (repetir del punto 11.1 al 11.11), pero utilizando estándares de nitrito y con la columna fuera de línea (off-line), de forma de determinar la concentración de nitrito de las muestras (ver 4087 UY). Esta concentración debe restarse al valor obtenido de la corrida de nitrato más nitrito.

Concentración NO_3 (mgN/L) = (Concentración NO_2 + NO_3 (mgN/L))- Concentración NO_2 (mgN/L).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (Área vs Concentración) y calcula la concentración del control y de las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no haya habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa según INE 78 y guardarlo en la carpeta correspondiente.

12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a los factores de dilución. También verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

Nota 4: Si no se realiza la determinación de nitrito según 11.11, es posible obtener el dato de NO3 + NO2 e informar el resultado como estos dos parámetros combinados.

Nota 5: Si NO_3 + NO_2 < LC, se informa NO_3 < LC sin analizar NO_2

Si NO2 < LC, se calcula (NO_3 + NO_2 – LD NO_2), se informa NO_3 como el valor obtenido matemáticamente.

Si NO2 < LD, se informa NO_3 = NO_3 + NO_2

Nota 6: Aunque el programa utilizado construya automáticamente la curva de calibración, se debe verificar que la misma tenga un coeficiente de correlación que cumpla con el criterio de aceptación definido ($R^2 \geq 0{,}995$) y que la curva con los puntos elegidos cubran el rango de concentración de la muestra, volver a integrar todos los picos de la corrida con la nueva curva de calibración.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo a la tabla del punto 10.2. Analizar el control de la secuencia luego de la curva de calibración, una cada 5 muestras y al final de la corrida. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes según gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Análisis por duplicado una de cada 5 muestras de aguas y una cada 3 muestras de efluentes industriales. Mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y contrastar con los límites de aceptación correspondiente según gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Fortificar las aguas con 100 µL y los efluentes industriales con 150 µL con una solución de aproximadamente 200 mg N/L, registrar el peso en RIN 33. Se fortifican todos los efluentes industriales y uno cada 5 muestras de agua. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos se encuentran bajo control, siendo 80 – 120 % el rango de aceptación, hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.4. **Control de la eficiencia de la columna de cadmio:** se debe correr en la corrida de Nitrato un estándar de concentración conocida de nitrato y un estándar de nitrito de la misma concentración, junto con los muestras. Calcular la eficiencia como:

$$Eficiencia\ (\%) = \left(\frac{(Conc\ NO3\ obtenida / Conc\ NO3\ teórica)}{(Conc\ NO2\ obtenida / Conc\ NO2\ teórica)} \right) \times 100$$

La eficiencia debe calcularse cada día de análisis de muestras, aceptándose hasta un 90 % en la eficiencia de la columna. En caso de ser inferior, sustituir la columna de cadmio por una nueva o regenerada, siguiendo las instrucciones del INE 78

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Methods Manual Lachat, method QuikChem 10-107104-1-A.

14.2. EPA Método Nº 353.3. (1974). Nitrogen, Nitrate-Nitrite (Colorimetric, Automated, CadmiumReduction).

14.3. EPA Método Nº 353.4. (1997). Determination of Nitrate and Nitrite in estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis.

14.4. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater , 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023"pp. 433-434 y 443-445.

14.5. Norma Mexicana NMX-AA-81-1986. Contaminación del Agua-Determinación de Nitrógeno de Nitrato en Agua Marina-Método de reducción de Nitrato a Nitrito en Columna de Cadmio.

14.6. U.S. Environmental Protection Agency. In: Ohrel RL, Register KM, eds. Volunteer Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual, 2nd ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; 2006. Chapter 14: Salinity. EPA-842-B-06-003. pp. 14-1 a 14-8.

4086UY

Determinación de la concentración de Nitrito en aguas naturales y efluentes industriales

Método colorimétrico

Elaborado - J. Piedrabuena

Modificado - H. Navarlatz

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta norma técnica se utiliza para la determinación de la concentración de nitrito (NO_2^-) en el rango aplicable de 4,9 a 1000 µg NO_2^- - N/L, en aguas naturales (incluyendo salobres o salinas) y efluentes industriales. El límite de detección es de 1,6 µg NO_2^- - N/L. Altas concentraciones de NO_2^- pueden determinarse diluyendo la muestra.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de equipo desionizador (INE 121).

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 94, INE 115).

2.7. Instructivo de uso espectrofotómetro (INE 145).

2.8. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

2.9. Ruta de análisis (RFQ 10).

2.10. Registro de preparación y estándares de nitrito (RPR06).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El ión nitrito, presenta un estado intermedio de oxidación del nitrógeno entre la oxidación a nitrato y en la reducción a amonio. Tanto la oxidación como la reducción pueden ocurrir en plantas de tratamiento de efluentes industriales, sistemas de distribución de aguas y aguas naturales.

3.2. Es un ión importante debido a que es el agente etiológico de la metahemoglobinemia. El ácido nitroso, el cual se forma a partir de este ión en solución ácida, puede reaccionar con aminas secundarias para formar nitrosaminas, algunas de las cuales son carcinógenas.

3.3. El nitrito es determinado a través de la formación de un colorante azo de color rojo púrpura, formado a pH 2,0-2,5 por la reacción de sulfanilamida diazotada con N- (1-naftil)- etilendiamina dihidrocloro (NED dihidricloro), presentando un máximo de absorción a 543 nm de longitud de onda.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada. En particular la solución estándar de nitrito.

4.3. Al realizar diluciones o manipular tanto ácidos concentrados como cloroformo, se debe trabajar en campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Por incompatibilidad química es improbable que coexistan NO_2^-, cloro libre y tricloro nitrógeno (NCl_3). Este último imparte un falso color rojo al agregar el reactivo colorante.

5.2. Los siguientes iones interfieren debido a que bajo las condiciones de reacción precipitan, por lo cual deben estar ausentes, estos son: Sb^{3+}, Au^{3+}, Bi^{3+}, Fe^{3+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Ag^+, cloroplatinato ($PtCl_6^{2-}$) y metavanadato (VO_3^{2-}). El ión cúprico puede causar bajos resultados por catalizar la descomposición de la sal de diazonio. Iones coloreados que alteren el color del sistema deben estar ausentes.

5.3. Los sólidos suspendidos son una interferencia por lo que deben ser removidos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en envases de vidrio o plástico (polietileno o equivalente); se requieren como mínimo 100 mL para la realización del análisis. Para preservar la muestra hasta por 48 hs, congelar a –20 °C o refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C).

6.2. No usar preservantes ácidos en las muestras en las que se analizará nitrito. La determinación debe hacerse lo más pronto posible sobre las muestras frescas para prevenir la conversión bacteriana de NO_2^- en NO_3^- o NH_3.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro que permita medida de la longitud de onda a 543 nm con paso óptico de al menos 1 cm (Spectronic 20 Genesys o similar).

7.2. Celdas de medición adecuadas al equipo anterior.

7.3. Desionizador de agua.

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 µL y 2,00-10,00 mL), con sus respectivos tips descartables.

7.5. Tubos de vidrio y tapa rosca de aprox. 30 mL de capacidad.

7.6. Balanza de resolución de 0,01 g.

7.7. Balanza de resolución 0,001 g.

7.8. Plancha térmica-magnética.

7.9. Pastillas magnéticas para agitación.

7.10. Bureta de 10 mL con precisión 0,5 mL.

7.11. Matraces aforados de 250 y 1000 mL.

7.12. Pipetas aforadas de 10,00 y 25,00 mL.

7.13. Erlenmeyer de 250 mL.

7.14. Equipo de filtración: bomba de vacío, kitasato, embudo Buchner de 47 mm de diámetro, recipiente receptor del filtrado.

7.15. Filtro de membrana de 0,45 µm de poro y 47 mm de diámetro.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01)

8.2. Reactivo de color: verter 200 mL de agua en Erlenmeyer de 250 mL, agregar 25 mL de ácido fosfórico 85 % (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2) y 2,5 g de sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$ Nro. CAS 63-74-1). Luego de la disolución completa de la sulfanilamida, agregar 0,25 g de N-(1 naftil)- etilendiamina dihidroclorohidrato ($C_{12}H_{14}N_2$.2HCl Nro. CAS 1465-25-4). Colocar en el ultrasonido para una mejor disolución, luego llevar a 250 mL con agua desionizada. Almacenar en botella color ámbar ≤ 6 °C (> 0 °C). Esta solución es estable por un mes.

8.3. Solución estándar de oxalato de sodio ($Na_2C_2O_4$ Nro. CAS 62-76-0); 0,025 M (0,05 N): pesar 3,3500 g de $Na_2C_2O_4$ patrón primario, disolver con agua en matraz aforado de 1000 mL, agitar hasta disolución, y luego enrasar.

8.4. Solución estándar de permanganato de potasio ($KMnO_4$ Nro. CAS 7722-64-7), 0,05 N: pesar 1,60 g de $KMnO_4$ disolver con agua desionizada, agitar hasta disolución y llevar a 1000 mL. Mantener en un frasco color ámbar cerrado en reposo por una semana. Cuidadosamente retire el sobrenadante pipeteando sin agitación. Como el $KMnO_4$ no es patrón primario se debe valorar contra la solución estándar de oxalato (ver 8.3).

8.5. Solución stock de nitrito: estándar comercial (de alrededor de 1400 mg NO_2^- N/L de concentración con valor certificado) o preparar la solución utilizando nitrito de sodio ($NaNO_2$ Nro. CAS 7632-00-0) grado reactivo 99 % de pureza. Para determinar el contenido de $NaNO_2$ adicionar una cantidad conocida de la solución del estándar de $KMnO_4$ (ver Valoración de soluciones) y reducir el color del permanganato adicionando una cantidad conocida del estándar reductor de $Na_2C_2O_4$ (0,025 M) y titular con la solución estándar de permanganato.

8.6. Preparación de la solución stock de nitrito a partir de $NaNO_2$: disolver 1,232 g de $NaNO_2$ en agua desionizada y diluir a 1000 mL (1,00 g = 250 µg de N). Preservar con 1 mL de cloroformo ($CHCl_3$ Nro. CAS 67-66-3). Esta solución debe ser valorada (ver: Valoración de soluciones).

8.7. Solución intermedia de nitrito: calcular el volumen, V, de la solución stock de NO_2^- a diluir de forma tal de obtener una solución final cuya concentración corresponda 1,00 mL de solución = 50 µg N. Para estándar comercial de 1400 mg NO_2^- N/L, tomar 0,1 mL de esta solución y llevar a 100 mL con agua desionizada. Preparar diariamente.

8.8. Solución estándar de nitrito: diluir 2,00 mL de la solución intermedia NO_2^- a 1000 mL con agua desionizada, 1,00 mL = 0,100 µg N (o sea 100 µg NO_2^- N /L). Para estándar comercial de 1400 mg NO_2^- N/L tomar 7,15 mL de solución intermedia de nitrito y diluir a 100 mL con agua (concentración: 100 µg NO_2^- N /L). Preparar diariamente.

8.9. Ácido clorhídrico 1 N (HCl Nro. CAS 7647-01-0)

8.10. Hidróxido de amonio 1 N (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6)

Valoración de soluciones

Valoración de la solución titulante de $KMnO_4$: Pesar entre 100-200 mg de oxalato de sodio con precisión de 0,1 mg, dentro de un Erlenmeyer de 400 mL. Adicionar 100 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver.

Agregar 10 mL de ácido sulfúrico (1+1) y calentar rápidamente hasta 90-95 °C. Colocar adecuadamente para la valoración, una bureta 10 mL, con solución de $KMnO_4$, (la bureta debe estar sobre la plancha térmica).

Cuando la temperatura de la solución de $Na_2C_2O_4$ es la adecuada, valorar gota a gota con agitación continua, hasta viraje de incoloro a rosado que persista por 1 minuto. La temperatura de la muestra no debe caer por debajo de los 85 °C. Titular un blanco con agua desionizada y H_2SO_4 en las mismas condiciones. El gasto estimado es de 6,0 mL de solución por cada 100 mg.

Valoración de la solución Stock de NO_2^-: Pipetear en orden: 10,00 mL de $KMnO_4$ 0,01 M, agregar en un Erlenmeyer de 125 mL, agregarle 1 mL de H_2SO_4 concentrado. Agregar 10,00 mL de solución stock de NO_2^- Sumergir la punta de la pipeta por debajo de la superficie de la solución ácida de permanganato. Agitar vigorosamente y colocarlo en una plancha térmica en el rango de 70-80 °C. Adicionar porciones de 10,0 mL del estándar de oxalato de sodio 0,025 M hasta que desaparezca el color del permanganato. Titular el exceso $Na_2C_2O_4$ con permanganato (0,01 M) hasta el viraje a rosado el cual es el fin de la reacción. Titular un blanco con agua desionizada en las mismas condiciones.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Se debe leer la absorbancia entre los 10 minutos y 2 horas de haber agregado el reactivo de color.

9.2. Se recomienda verificar el pH de la muestra luego de haber agregado 1 mL reactivo de color. Si el pH no se encuentra entre 2,0 y 2,5, entonces agregar menos reactivo colorante hasta que el pH sea el deseado. La curva de calibración debe ser preparada con el mismo volumen de reactivo de color.

9.3. En la valoración de la solución estándar tanto cuando se agrega ácido como cuando se calienta la solución, se debe colocar un papel de aluminio en la boca del Erlenmeyer para minimizar las pérdidas de sustancias volátiles.

9.4. Remover los sólidos suspendidos de la muestra por filtración utilizando filtro de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una curva de calibración de al menos 4 estándares dentro del rango de 5 - 100 µg NO_2^- - N/L a partir de una solución estándar de nitrito de 100 µg NO_2^- N/L.

Vol. de solución estándar (mL)	Volumen final (mL)	Concentración (µg NO_2^- N/L)
0,00	25	0
1,25	25	5
2,50	25	10
5,00	25	20
12,50	25	50
25,00	25	100

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

10.3. Leer la absorbancia antes del agregado del reactivo de color de todos los tubos conteniendo las soluciones de la curva de calibración (absorbancia blanco o absorbancia inicial).

10.4. Agregar 1,0 mL de reactivo de color a cada estándar, homogeneizar. Leer la absorbancia a 543 nm entre los 10 minutos y las 2 horas de agregado el reactivo de color.

10.5. Realizar la gráfica a (Abs. Standard- Abs. blanco o inicial) en función de la concentración de nitrito µg NO_2^- - N/L.

10.6. Se pueden realizar las tomas en volumen o en peso tanto para la curva como para las muestras, considerando la densidad del agua (ver 10.2).

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Filtrar la muestra con filtro de tamaño de poro de 0,45 µm para eliminar la turbidez que pueda presentar. Si el pH de la muestra no está entre 5 y 9 ajustar el pH a dicho rango, gota a gota, con HCl 1N o NH_4OH 1N según corresponda.

11.2. Pesar 25,00 g de muestra o una alícuota de la misma y llevar a 25,00 g.

11.3. Medir la absorbancia a 543 nm previo al agregado del reactivo de color (Abs. blanco o inicial).

11.4. Agregar 1,0 mL de reactivo colorante a la muestra, homogeneizar. Leer la absorbancia a 543 nm entre los 10 minutos y las 2 horas de agregado el reactivo colorante.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Concentración de la solución de $KMnO_4$ en normalidad:

$$KMnO_4,\ eq/L = \frac{g\ Na_2C_2O_4}{(A-B) \times 0{,}067}$$

donde:

A: corresponde a mL titulados por muestra

B: corresponde a mL titulados por blanco

12.2. Concentración de la solución stock nitrito en mg NO_2^-/L

$$\text{Solución stock, mg } NO_2^- \text{ N/L} = \frac{[\,(B \times C) - (D \times E)\,] \times 7}{F}$$

donde:

B: corresponde a mL totales del estándar de $KMnO_4$ usados en la titulación de la solución de $NaNO_2$. (10,00 mL de toma más el gasto de titulación)

C: corresponde a la normalidad del estándar de $KMnO_4$

D: corresponde a mL de la solución de Na_2C2O_4 agregados

E: corresponde a la normalidad de la solución de $Na_2C_2O_4$

F: corresponde al volumen en mL de la solución stock de $NaNO_2$ utilizada en la titulación

Nota 1: Cada 1,00 mL de $KMnO_4$ 0,01 M (0,05 N) consumido por la solución de $NaNO_2$ corresponde a 1750 µg NO_2^--N.

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

$$(Abs_{\text{estándar}} - Abs_{\text{blanco}}) = a \times (\mu g\ NO_2^-\ N/L) + b$$

donde:

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

12.4. La concentración de nitrito se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Nitrito, } \mu g\ NO_2^-\ N/L = \frac{(Abs_{\text{muestra}} - Abs_{\text{blanco}} - b) \times FD}{a}$$

donde:

FD: es el factor de dilución de la muestra

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la precisión:** Se debe realizar un duplicado cada tres muestras, mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de Rangos Normalizados correspondientes, de lo contrario repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

13.2. **Control de la exactitud:** Tomar una cantidad determinada de la solución de "Control de Nitrito" (elaborada por el responsable de Calidad o solución comercial) de manera que se encuentre ubicada su concentración en el centro de la curva de calibración, para procesar simultáneamente con las muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

13.3. **Fortificación:** Fortificar 1 de cada 5 muestras para calcular el porcentaje de recuperación de la adición. Se debe comparar el resultado con los límites de aceptación del gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y repetir el análisis (según Manual de Control de Calidad Analítico).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 4500 – NO_2 - A Nitrite Introduction y 4500 NO2 - B Colorimetric Method pp. 449-451.

4087UY

Determinación de la concentración de nitrito en aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales

Método FIA

Elaborado - E. Rodó

Modificado - C. Grau

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrito en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Mediante este procedimiento se puede determinar la concentración de nitrito en un rango de 0,05 - 20 mg N/L. Puede ampliarse el valor superior, por diluciones de la muestra. Límite de detección 10 µg N/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINCEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso de balanzas (INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 115)

2.6. Instructivo de uso del FIAS (INE 78)

2.7. Ruta de análisis (RIN 33)

2.8. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121)

2.9. Instructivo para el uso del destilador (INE 109)

2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El ión nitrito, presenta un estado intermedio de oxidación del nitrógeno entre la oxidación a nitrato y en la reducción a amonio. Tanto la oxidación como la reducción pueden ocurrir en plantas de tratamiento de efluentes industriales, sistemas de distribución de aguas y aguas naturales.

3.2. Es un ión importante debido a que es el agente etiológico de la metahemoglobinemia. El ácido nitroso, el cual se forma a partir de este ión en solución ácida, puede reaccionar con aminas secundarias para formar nitrosaminas, algunas de las cuales son carcinógenas.

3.3. El nitrito es determinado mediante la formación de un compuesto azo de color rojo por la reacción con sulfanilamidadiazotada y N - (1 - naftil) - etilendiaminadihidrocloro (NED dihidricloro). El compuesto formado, altamente coloreado, es medido espectrofotométricamente a 520 nm de longitud de onda.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica y guantes. En caso de ser necesario, utilizar gafas de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada. En particular la solución estándar de nitrito.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Por incompatibilidad química es improbable que coexistan NO_2^-, cloro libre, y tricloro nitrógeno (NCl_3). Este último imparte un falso color rojo al agregar el reactivo colorante.

5.2. Los sólidos suspendidos deben removerse por filtración utilizando filtros de membrana de 0,45 de diámetro de poro.

5.3. La muestra deberá presentar un pH entre 7 y 9, por lo que, si no se encuentra en este rango, deberá ajustarse con HCl o NaOH, según corresponda.

5.4. Pueden obtenerse bajos resultados con muestras que presenten altas concentraciones de hierro, cobre u otros metales. En el presente método, el EDTA es añadido al buffer de forma de reducir este tipo de interferencia.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de plástico o vidrio. Se requiere al menos 100 mL de muestra para realizar el análisis.

6.2. No usar preservantes ácidos en las muestras en las que se analizará nitrito. La determinación debe hacerse lo más pronto posible sobre las muestras frescas para prevenir la conversión bacteriana de NO_2^- en NO_3^- o NH_3. En caso de ser necesario ampliar el margen, mantener a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C) y analizar dentro de las 48 horas de extraída la muestra.

6.3. Las muestras deben ser prefiltradas si concentración de los sólidos suspendidos pudiera afectar el flujo del análisis en la unidad FIA. Muestras líquidas límpidas pueden medirse sin filtración previa sólo si se comprueba que su turbidez es menor a 1 NTU.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de inyección de flujo diseñado para tomar y reaccionar con la muestra y reactivos en el orden y en las proporciones requeridas (INE 78)

7.2. Balanza analítica con precisión de 0,001 g (Precisa 205A o similar)

7.3. Matraces aforados de 1000 mL

7.4. Material de vidrio graduado de capacidad entre 100 y 500 mL

7.5. Pipetas automáticas de volumen variable (100-1000 µL) y (1,00 – 10,00 mL)

7.6. Balanza con resolución de 0,01 g (AND HF-2000G o similar)

7.7. Equipo de filtración para eliminar turbidez compuesto por: bomba de vacío, kitasato, embudo Buchner de 47 mm de diámetro, recipiente receptor de filtrado.

7.8. Filtro de membrana de 0,45 µm de poro.

7.9. Termómetro o sensor de temperatura acorde para la valoración de solución de nitrito (en caso que corresponda).

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Hidróxido de sodio 15 N (NaOH Nro. CAS 1310-73-2): Disolver lentamente 150 g de NaOH en 250 mL de agua desionizada en recipiente de vidrio. Agitar con agitador magnético hasta disolver completamente. Se debe tener precaución ya que esta solución libera calor por ser exotérmica. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, almacenar en botella de plástico.

8.3. Buffer de cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125 -02-9), opción 1: en un recipiente de 1 L de capacidad, agregar 85 g de cloruro de amonio, 1,0 g de EDTA disódicodihidratado ($Na_2EDTA.2H_2O$ Nro. CAS 6381-92-6) y 938 g de agua desionizada. Agitar con agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH hasta 8.5 con la solución de hidróxido de sodio 15 N.

8.4. Buffer de cloruro de amonio, opción 2: en un recipiente de 1 L agregar 800 g agua desionizada, 126 g de ácido clorhídrico concentrado (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 85 g de cloruro de amonio y 1,0 g de EDTA disódicodihidratado. Agitar con agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH hasta 8,5 con la solución de hidróxido de sodio 15 N o HCl.

Nota 1: El cloruro de amonio utilizado en el buffer 8.3 puede llegar a presentar contaminación con nitrato, si se observan cambios en los blancos de reactivos, se sugiere utilizar el buffer 8.4.

8.5. Reactivo colorante: añadir a un recipiente de capacidad 1 L color ámbar 876 g de agua desionizada, 170 g de ácido ortofosfórico 85 % (H_3PO_4 Nro. CAS 7664-38-2), 40,0 g de sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$ Nro. CAS 63-74-1) y 1,0 g de N-(1 naftil)- etilendiaminadihidrocloro (NED $C_{12}H_{14}N_2.2HCl$ Nro. CAS 1465-25-4). Agitar utilizando agitador magnético durante 30 minutos hasta disolver. Esta solución es estable durante un mes.

Nota 2: Todos los reactivos deben ser almacenados en recipientes de vidrio.

8.6. Solución stock de nitrito: Estándar comercial (de alrededor de 1000 mg NO_2/L de concentración con valor certificado) o preparar la solución utilizando nitrito de sodio ($NaNO_2$ Nro. CAS 7631-99-4. Para determinar el contenido de $NaNO_2$ adicionar una cantidad conocida de la solución del estándar de permanganato de potasio ($KMnO_4$ Nro. CAS 7722-64-7 - ver valoración de soluciones) y reducir el color del permanganato adicionando una cantidad conocida del estándar reductor de oxalato de sodio 0,025 M ($Na_2C_2O_4$ Nro. CAS 62-76-0) y titular con la solución estándar de permanganato.

8.7. Preparación de la solución stock de nitrito a partir de $NaNO_2$: disolver 1,232 g de $NaNO_2$ en agua desionizada y diluir a 1000 mL (1,00 g = 250 µg de N). Preservar con 1 mL de cloroformo ($CHCl_3$ 67-66-3). Esta solución debe ser valorada (ver: valoración de soluciones).

8.8. Solución intermedia de nitrito: Evaluar la pertinencia de requerir esta solución. En caso necesario, preparar diariamente en base al rango de concentraciones en las que se desee trabajar.

8.9. Ácido clorhídrico 1 N.

8.10. Hidróxido de amonio 1 N (NH_4OH Nro. CAS 1336-21-6).

Valoración de soluciones

Valoración de la solución titulante de $KMnO_4$: Pesar entre 100-200 mg de oxalato de sodio con precisión de 0,1 mg, dentro de un Erlenmeyer de 400 mL. Adicionar 100 mL de agua desionizada y agitar hasta disolver.

Agregar 10 mL de ácido sulfúrico (1+1) y calentar rápidamente hasta 90 – 95 °C. Colocar adecuadamente para la valoración, una bureta 10 mL, con solución de $KMnO_4$, (la bureta debe estar sobre la plancha térmica), cuando la temperatura de la solución de $Na_2C_2O_4$ es la adecuada, valorar gota a gota con agitación continua, hasta viraje de incoloro a rosado que persista por 1 minuto. La temperatura de la muestra no debe caer por debajo de los 85 °C. Titular un blanco con agua desionizada y ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9) en las mismas condiciones. El gasto estimado es de 6,0 mL de solución por cada 100 mg.

Valoración de la solución Stock de NO_2-:

Pipetear en orden, 10,00 mL de $KMnO_4$ 0,01 M, agregar en un Erlenmeyer de 125 mL, agregarle 1 mL de H_2SO_4 concentrado. Agregar 10,00 mL de solución stock de NO_2. Sumergir la punta de la pipeta por debajo de la superficie de la solución ácida de permanganato. Agitar vigorosamente y colocarlo en una plancha térmica en el rango de 70 – 80 °C. Adicionar porciones de 10 mL del estándar de oxalato de sodio 0,025 M hasta que desaparezca el color del permanganato. Titular el exceso $Na_2C_2O_4$ con permanganato (0,01 M) hasta el viraje a rosado el cual es el fin de la reacción. Titular un blanco con agua desionizada en las mismas condiciones.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Se recomienda realizar el análisis dentro de las 24 horas de realizado el muestreo. Si esto no es posible, preservar la muestra en heladera a temperatura ≤6 °C (> 0 °C) por 48 h a partir de realizado el muestreo.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

Curva de calibración

10.1. Dependiendo de las muestras a analizar, se sugiere la preparación de al menos 5 puntos incluyendo el blanco siguiendo la siguiente tabla:

Estándar de trabajo (Preparar diariamente) (mg N/L)	A 20,0	B 5,0	C 1,0	D 0,5	E 0,25	F 0,125	G 0,05
Pesar (g) de la Sol Stock y diluir a un peso final de 50 g con agua desionizada	3,3	0,8	---	---	---	---	---
Pesar (g) del estándar By diluir a un peso final de 50 g con agua desionizada	---	---	10	5,0	2,5	1,25	0,5

Nota 3: Se asume densidad de las muestras 1 g/mL.

Nota 4: Los reactivos y estándares deben estar a temperatura ambiente previo a su utilización en el equipo de FIA.

Nota 5: No es posible prescindir de la solución G.

10.2. Encender y dejar estabilizar el Equipo FIA según INE78 y seguir las instrucciones allí detalladas.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Si la muestra presenta turbidez filtrar con filtro de tamaño de poro de 0,45 µm. Si el pH de la muestra no está entre 5 y 9 ajustar el pH al dicho rango, gota a gota, con HCl 1 N o NH_4OH 1 N según corresponda.

11.2. Para efluentes se sugiere realizar una dilución previa de al menos 10 veces aproximadamente. Registrar la toma de muestra y la masa final de la dilución en RIN 33. Las muestras de agua se analizan sin dilución previa.

11.3. Encender el equipo de inyección en flujo.

11.4. Verificar que la columna esté fuera de línea, colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua desionizada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

11.5. Colocar uno a uno en el orden que aparece en el Manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar por unos 10 minutos.

11.6. Realizar una alícuota de las muestras a analizar y colocarlas en los tubos del rack del autosampler, después de haber colocado los estándares de la curva de calibración (menor a mayor concentración), blanco (solo agua desionizada) y controles.

11.7. Verificar en el programa que este seteado correctamente el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.

11.8. Ingresar en el programa del sistema la secuencia de análisis deseada con los valores de concentración de los estándares, controles de nitrato y nitrito para el control de la columna de cadmio y muestras.

11.9. No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.

11.10. Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

11.11. Si no se va a analizar otra corrida de análisis, colocar todas las líneas de reactivos en agua desionizada y dejar circular durante 15 a 30 minutos. Por último, quitar todas las líneas del agua y dejar la bomba encendida para que circule aire durante 15 a 30 minutos de manera de secar las líneas del Manifold.

11.12. Apagar todo el equipo y distender los tubos que pasan por la bomba.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (Área vs Concentración) y calcula la concentración del control y de las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no haya habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa según INE 78 y guardarlo en la carpeta correspondiente.

12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a los factores de dilución. También verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

Nota 6: Aunque el programa utilizado construya automáticamente la curva de calibración, se debe verificar que la misma tenga un coeficiente de correlación que cumpla con el criterio de aceptación definido ($R^2 \geq 0{,}995$) y que la curva con los puntos elegidos cubran el rango de concentración de la muestra, volver a integrar todos los picos de la corrida con la nueva curva de calibración.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración con un material de referencia certificado o un reactivo de lote diferente al de la solución 8.6. Analizar el control luego de la curva de calibración, una cada 5 muestras y al final de la corrida. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes según gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Análisis por duplicado una de cada 5 muestras de aguas y una cada 3 muestras de efluentes industriales. Mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y contrastar con los límites de aceptación correspondiente según gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Fortificar las aguas con 100 µL y los efluentes industriales con 150 µL con una solución de aproximadamente 200 mg N/L, registrar el peso en RIN 33. Se fortifican todos los efluentes industriales y uno cada 5 muestras de agua. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos se encuentran bajo control, siendo 80 – 120 % el rango de aceptación, hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 4500-NO3 E Cadmium Reduction Method. pp 438-440.

14.2. Methods Manual Lachat, method QuickChem 10-107104-1-A

14.3. EPA Método Nº 353.3. (1974). Nitrogen, Nitrate-Nitrite (Colorimetric, Automated, Cadmium Reduction).

4090UY

Determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas y efluentes

Flow Injection Analysis (FIA)

Elaborado - C. Grau

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango de trabajo es de 0,84 a 1750 mg N/L. El límite de detección es de 0,28 mg N/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 111)

2.6. Instructivo de uso de block de digestión BD 40 (INE 112)

2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16A, INE 16B, INE 94, INE 115 e INE 153)

2.8. Ruta de análisis (RFQ 34 y RFQ 35)

2.9. Planillas de cálculo electrónicas

2.10. Instructivos de uso del destilador y desionizador de agua (INE 109 e INE 121)

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Nitrógeno Total Kjeldahl es la suma de los compuestos libres de amonio y de nitrógeno orgánico que se convierten en sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, bajo las condiciones de la digestión descripta.

Las muestras se digieren en presencia de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4), y sulfato de cobre ($CuSO_4$).

La muestra es inyectada en la placa donde su pH se controla elevando a un pH básico conocido con un tampón concentrado. Esta neutralización en línea convierte el catión de amonio en amoníaco, y también evita la influencia indebida de la matriz de ácido sulfúrico en la reacción de color sensible al pH que sigue.

El amoníaco producido se calienta luego con salicilato e hipoclorito para producir un color azul, que es proporcional a la concentración de amoníaco. El color se intensifica mediante la adición de nitroprusiato de sodio.

La absorbancia del pico resultante se mide a 660 nm. El área del pico es proporcional a la concentración de Nitrógeno total kjeldahl en la muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. Prestar especial cuidado con posibles proyecciones en el momento del agregado de agua desionizada luego de digerida la muestra.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Durante la digestión de Nitrógeno Total Kjeldahl, si la muestra tiene un contenido de NO_3 superior a 10 mg N/L, éste puede oxidar una porción del amoníaco liberado del Norg digerido, produciendo N_2O y dando como resultado una interferencia negativa.

5.2. Cuando hay suficiente materia orgánica en un bajo estado de oxidación, el NO_3 puede reducirse a amoníaco, dando como resultado una interferencia positiva.

Las condiciones en las que se producen las interferencias significativas no están bien definidas, por lo tanto, no existe una manera comprobada de eliminar dichas interferencias para esta metodología. En cada caso particular, se deben contrastar los resultados obtenidos de amonio, NTK y nitratos para verificar la coherencia del balance de compuestos nitrogenados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar una cantidad de muestra que sea representativa (cantidad de muestra típica, 250mL) en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y refrigerar a menos de 6 °C (mayor a 0 °C). Realizar el análisis lo antes posible, luego de realizado el muestreo.

De no ser posible, preservar la muestra a pH < 2 con H_2SO_4 concentrado o congelar a -20 °C y analizarla antes de los 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución mínima de 0,001 g, para toma de muestra y estándares.

7.2. Balanza de resolución mínima de 0,01 g, para preparación de reactivos.

7.3. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 – 10,00) mL y (100 – 1000) µL.

7.4. Matraces Erlenmeyer de 150mL ó 250mL.

7.5. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold para la determinación de NTK (LACHAT QuickChem 8500 series 2 o similar)

7.6. Block de digestión

7.7. Equipo para la generación de agua desionizada

8. REACTIVOS

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

8.2. **Reactivos:**

Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9)

Sulfato de potasio (K_2SO_4Nro. CAS 7778-80-5)

Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4$.$5H_2O$ Nro. CAS 7758-99-8)

Tartrato de sodio y potasio (D, L-$NaKC_4H_4O_6$.$4H_2O$ Nro. CAS 6381-59-5)

Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2)

Fosfato de sodio (dibásico heptahidratado (Na_2HPO_4.$7H_2O$) Nro. CAS 7782-85-6)

Salicilato de sodio (sal sódica del ácido salicílico ([C_6H_4(OH)(COO) Na] Nro. CAS 54-21-7)

Nitroprusiato de sodio (dihidratonitroferricianuro sódico ([Na_2Fe (CN) $_5$NO.$2H_2O$] Nro. CAS 13755-38-9)

Hipoclorito de sodio (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9)

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

8.3. **Solución de digestión:**

En un matraz aforado de 1 L, con 700mL de agua 8,1, añadir 134,0 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) y 134mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Añadir 11,4 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4$.$5H_2O$). Diluir hasta el aforo con agua 8.1 e invertir para mezclar. Mantener bien cerrado cuando no esté en uso para reducir la posibilidad de contaminación por amoniaco del ambiente. Preparar mensualmente.

8.4. **Buffer:**

En un recipiente de 1 L añadir 900mL de agua 8.1, 50 g de tartrato de sodio y potasio, D, L-$NaKC_4H_4O_6$.$4H_2O$), 50 g de hidróxido de sodio (NaOH), y 26,8 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na_2HPO_4.$7H_2O$) mezcla hasta disolver. Hervir durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y transferir a un matraz aforado de 1 L. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar. Preparar mensualmente.

Nota 2: Para reducir la posibilidad de que el tartrato de potasio sea contaminado, se recomienda que el buffer de tartrato se hierva durante 10 minutos. Para verificar que el buffer de tartrato es lo suficientemente puro, comparar la línea de base de reactivo a la línea de base de agua desionizada. La línea de base con todos los reactivos no debe tener una diferencia mayor de 0,15V con la línea de base de agua desionizada.

8.5. **Nitroprusiato - Salicilato:**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L disolver 150,0 g de salicilato de sodio [sal sódica del ácido salicílico, C_6H_4(OH) (COO) Na], y 1,00 g nitroprusiato de sodio [dihidratonitroferricianuro sódico, Na_2Fe (CN) $_5$NO.$2H_2O$] en aproximadamente 800mL de agua 8.1. Diluir hasta la marca e invertir para mezclar. Guarde en un frasco oscuro y preparar mensualmente, o cuando la solución desarrolle un color azul-verdoso.

Preparación por Peso:

En un frasco de vidrio ámbar del 1 L agregar 150.0g salicilato de sodio [sal sódica del ácido salicílico, C_6H_4(OH) (COO) Na], y 1,00 g nitroprusiato de sodio [dihidratonitroferricianuro sódico, Na_2Fe (CN) $_5$NO.$2H_2O$] en 908 g de agua 8.1. Agitar hasta disolver. Preparar mensualmente, o cuando la solución desarrolle un color azul-verdoso.

8.6. **Hipoclorito de sodio (100mL/L):**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 250mL, diluir 25,0mL de hipoclorito de sodio al 5,25 % (NaOCl),

hasta la marca con agua 8.1. Invertir para mezclar. Preparar diariamente.

Preparación por Peso:

En un matraz de 250mL, agregar 26,7g de hipoclorito de sodio al 5,25 % (NaOCl) y 225 g de

agua 8.1. Agitar para mezclar. Preparar diariamente.

8.7. **Solución estándar de Nitrógeno total Kjeldhal, 500 mg N/L:** En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,9095 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) (previamente secado durante dos horas a 110 °C) en aproximadamente 800mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

8.8. **Solución estándar de Nitrógeno total Kjeldhal, 50 mg N/L:** A partir de la solución 8.7. realizar una dilución de 10 veces, la toma y el volumen final deben ser realizados por peso utilizando una balanza con resolución 0,001g. También se puede trabajar con material de referencia certificado, realizando la dilución correspondiente.

8.9. **Solución control de Nitrógeno total Kjeldhal, 500 mg N/L:** En un matraz aforado de 1L, disolver 1,9095g de cloruro de amonio (NH_4Cl) (previamente secado durante dos horas a 110°C) en aproximadamente 800mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

Nota 3: El reactivo utilizado para preparar tanto la solución estándar como la solución control deben ser de marcas distintas o por lo menos números de lotes distintos.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Las muestras no deben consumir más del 10 % del ácido sulfúrico durante la digestión. Este consumo de ácido se puede detectar cuando se mide la densidad de la muestra digerida y se encuentran diferencias significativas entre las densidades. En caso de que esto ocurra, evaluar la posibilidad de repetir la muestra realizando una dilución mayor o estandarizar la muestra digerida con una solución de hidróxido de sodio, determinando así el excedente de ácido sulfúrico consumido en la digestión. Luego de realizada la estandarización, es necesario reanalizar la muestra con una dilución mayor.

9.2. Las digestiones deben estar libres de turbidez. Las piedras de ebullición pueden causar cierta turbidez. Para evitar que esto ocurra, hacer la toma para la medición del sobrenadante.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de estándares usando como referencia el siguiente cuadro utilizando la solución 8.8:

Masa std (g)	Masa final (g)	Concentración aprox. final (mg N/L)
0,25	50	0,25
0,75	50	0,75
1,5	50	1,5
5,0	50	5,0
10,0	50	10,0
17,5	50	17,5
25,0	50	25,0
35,0	50	35,0

Preparar al menos 4 puntos más el blanco.

10.2. Preparar al menos una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de un material de referencia certificado o partir de la solución 8.9, de acuerdo a la siguientes diluciones considerando el rango de concentración de la curva que se va a utilizar:

Concentración Std (mg N/L)	Masa solución control (g)	Masa final (g)	Concentración aprox. final (mg N/L)
500	0,25	25	5,0
500	1,0	25	20

Nota 4: Se asume una densidad de 1 g/mL.

Nota 5: Se sugiere preservar los estándares de la curva, blancos y controles con 2mL/L de H_2SO_4 concentrado. Estos pueden ser almacenados por 28 días una vez que hayan sido preservados, de lo contrario, preparar las diluciones correspondientes nuevamente.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Digestión de la muestra (muestras, curva de calibración, blancos y controles de calidad):

11.1.1. Las muestras, estándares, blancos y controles de calidad deben estar previamente preservados con H_2SO_{4conc} (2mL/L), en caso de emplear la curva preservada. Para el caso de empleo de soluciones sin preservar, realizar la validación correspondiente.

11.1.2. Para efluentes se sugiere realizar una dilución previa a la digestión de 10 veces aproximadamente. Registrar la toma de la muestra y la masa final de la dilución. Las muestras de aguas se analizan sin dilución previa.

11.1.3. Colocar piedras de ebullición en el tubo para digestión, tarar la balanza y registrar el peso del tubo en el RFQ 34 o RFQ 35 según corresponda.

11.1.4. Sin tarar la balanza realizar una toma de aproximadamente 25mL y registrar el peso.

11.1.5. Agregar en cada tubo 10mL de solución de digestión con pipeta automática.

11.1.6. Colocar todos los tubos en el block de digestión Lachat BD-40, encender el equipo y seleccionar el programa deseado (el programa utilizado es DIG_NTK 3). Verificar que las condiciones de digestión sean las siguientes: Paso 1 a 150 °C, T rampa 30 minutos, Ta estable 60 minutos, Paso 2 a 250 °C, T rampa 80 minutos, Ta estable 40 minutos, Paso 3 a 390 °C, T rampa 40 minutos, Ta estable 30 minutos.

11.1.7. Finalizada la digestión, retirar la gradilla con los tubos del digestor y colocarlos en el soporte para enfriar, antes de pasados 10 minutos, agregar una pequeña cantidad de agua desionizada 8.1 en cada tubo para evitar la formación de material sólido.

11.1.8. Cuando el digerido alcance temperatura ambiente, llevar a 25mL con agua desionizada 8.1 y registrar el peso del tubo. Homogeneizar utilizando un vórtex.

11.1.9. Medir la densidad de la curva de calibración, blancos, controles y muestras, pesando 1mL del digerido con pipeta automática calibrada. Registrar el peso.

Nota 6: Los estándares de la curva de calibración tienen una vigencia de 28 días luego de la digestión, por lo que si se va a analizar muestras dentro de ese período, se utiliza esa curva de calibración ya digerida.

11.2. **Determinación instrumental:**

11.2.1 Encender el equipo de inyección en flujo.

11.2.2 Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

11.2.3 Colocar uno a uno y en el orden que aparecen en el Manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar por unos 10 minutos.

11.2.4 Colocar una porción de cada digerido a analizar en los tubos del rack del autosampler seguido de los estándares de la curva (de menor a mayor concentración), controles y blancos.

11.2.5 Verificar en el computador, en el ícono de la configuración del instrumento, que esté correctamente seteado el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.

11.2.6 Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.

11.2.7 No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.

11.2.8 Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (Área vs Concentración) y calcula la concentración del control y de las muestras.

12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no haya habido ninguna interferencia en la secuencia.

12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa y guardarlo en la carpeta correspondiente.

12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a las tomas de muestras realizadas, densidades correspondientes y factores de dilución. También verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

$$\text{Conc NTK (mgN/L)} = \frac{C_o \; x \; m_{muestra\ digerida}(g) x \; FD}{densidad \; x \; m_{muestra\ inicial}\,(g)}$$

Nota 7: Aunque el programa utilizado construya automáticamente la curva de calibración, se debe verificar que la misma tenga un coeficiente de correlación que cumpla con el criterio de aceptación definido ($R^2 \geq 0{,}995$) y que la curva con los puntos elegidos cubran el rango de concentración de la muestra, volver a integrar todos los picos de la corrida con la nueva curva de calibración.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Preparar los controles de la curva de calibración de acuerdo a la tabla del punto 10.2. Analizar los controles en la secuencia luego de la curva de calibración o al final de toda la corrida. Obtener los resultados del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes, según gráfico de control. Si los resultados obtenidos están fuera de control, evaluar repetición de análisis y proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Analizar por duplicado uno cada 5 muestras de aguas o efluentes. Mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes según gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, evaluar repetición de análisis y proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Repetir desde el punto 11.1.3 al 11.1.4. Fortificar las aguas con 100 µL y los efluentes con 250 µL con una solución de 500 mg N/L, registrar el peso. Repetir desde el punto 11.1.5 al 11.1.8. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. En el caso de los efluentes que llevan una dilución previa a la digestión, se fortifica la dilución y no la muestra original. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y contrastarlos con los límites de aceptación correspondientes según gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, evaluar repetición de análisis y proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. LACHAT, QuikChem® Method 10-107-06-2-P, DETERMINATION OF TOTAL KJELDAHL NITROGEN BY FLOW INJECTION ANALYSIS COLORIMETRY (Cooper catalyst / block digestor method).

14.2. EPA Method 351.2, DETERMINATION OF TOTAL KJELDAHL NITROGEN BY SEMI-AUTOMATED COLORIMETRY, Revision 2.0, August 1993.

14.3. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. 4500-Norg A Introduction, D Block digestion and flow injection analysis. pp 451-452 y 454-457.

4091UY

Determinación de Nitrógeno total Kjeldahl en matrices sólidas (suelos, sedimentos y residuos sólidos industriales)

Análisis por inyección en flujo (FIA)

Elaborado - R. Mendes

Modificado - M. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se aplica para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl en matrices sólidas, tales como: suelos, sedimentos y residuos sólidos industriales. Este método analítico no incluye la determinación de nitrógeno en forma nitrato/nitrito, tampoco de aquellos compuestos donde el nitrógeno presenta enlaces especiales (compuestos heterocíclicos).

Mediante este método analítico se puede cuantificar el contenido nitrógeno total Kjeldahl en el rango 33 – 6875 mg N/kg en base seca; es posible ampliar el rango de trabajo mencionado aplicando diluciones en la solución resultante de la digestión.

El límite de detección del mismo es de 11 mg N/kg en base seca.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de la Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso del desionizador de agua (INE 121)

2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 115, INE 16A e INE 16B)

2.7. Instructivo de uso balanza de humedad (INE 113)

2.8. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 111)

2.9. Instructivo de uso del digestor (INE 112)

2.10. Ruta de análisis (RFQ 39, RFQ 34, RFQ 36)

2.11. Procedimiento analítico para muestras ambientales 1050UY: Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método Kjeldahl para la determinación de nitrógeno involucra una digestión húmeda por la cual se transforma todo el nitrógeno orgánico, contenido en la muestra, en la forma amonio NH_{4+}-N.

3.2. Dicha digestión se realiza en medio ácido dado por el ácido sulfúrico, en presencia de un catalizador (sulfato de cobre) y de sulfato de potasio, cuya función es elevar el punto de ebullición del ácido mencionado.

3.3. Luego, el digerido obtenido es inyectado en la placa del FIA. En esta etapa, ocurre una reacción de neutralización por la acción de un buffer de pH alcalino, por la cual se convierte el catión amonio en amoníaco. Además, en estas condiciones de pH se elimina la interferencia del ácido en la reacción de desarrollo de color, la cual es sensible a las condiciones de pH.

3.4. Por último, la cuantificación del analito se lleva a cabo mediante una reacción colorimétrica entre el amoníaco y el reactivo de desarrollo de color (nitroprusiato de sodio/salicilato de sodio/hipoclorito de sodio). El complejo generado en la reacción descripta, cuyo color azul es proporcional a la concentración de analito, se mide a 660 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El analista debe utilizar túnica, guantes y lentes de seguridad a la hora de desarrollar el análisis.

4.2. Cada reactivo utilizado debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, por lo que se debe manipular cada uno con suma precaución.

4.3. Prestar especial cuidado con posibles proyecciones en el momento del agregado de agua desionizada tras haber culminado la digestión de la muestra.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Nitratos en concentraciones altas oxida el amonio formado por la digestión, causando un error sistemático negativo. Actualmente, no existe un método para prevenir dicha interferencia, sin embargo, se puede predecir su efecto realizando una determinación preliminar de los nitratos en la muestra.

5.2. Sales inorgánicas aumentan la temperatura a la cual ocurre la digestión, si dicha temperatura excede los 400ºC, estas condiciones provocarán pérdida pirolítica de nitrógeno. Cuando hay sospecha de que esto ocurra, la adición de volúmenes adicionales de ácido sulfúrico en forma previa a la digestión, estabilizará la temperatura.

5.3. Cantidades elevadas de materia orgánica consumen el ácido del reactivo de digestión, elevando la temperatura de la digestión. Se debe agregar ácido sulfúrico en exceso para evitar esta interferencia

Las condiciones en las que se producen las interferencias significativas no están bien definidas, por lo tanto, no existe una manera comprobada de eliminar dichas interferencias para esta metodología.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar aproximadamente 200 g de muestra con la ayuda de una draga en bolsa de plástico. Si el análisis no se va a realizar inmediatamente luego de haber ingresado la muestra al laboratorio, se debe preservar la misma a una temperatura de -20 °C hasta el momento de su análisis, en un período máximo de 28 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza con resolución de 0,001 g para toma de muestra y estándares.

7.2. Balanza con resolución de 0,01 g para preparación de reactivos.

7.3. Balanza de humedad.

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable de rango 1 – 10mL y 100 – 1000 µL.

7.5. Tubos Falcon de 50mL.

7.6. Equipo de filtración Buchner.

7.7. Filtros de 47 mm de diámetro de acetato de celulosa y tamaño de poro 0.45µm.

7.8. Tubos de digestión de 100mL.

7.9. Vórtex.

7.10. Digestor adecuado para los tubos empleados.

7.11. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold para la determinación de NTK (LACHAT QuickChem 8500 series 2).

7.12. Desionizador de agua.

7.13. Campana de extracción de gases.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01)

8.2. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9)

8.3. Cloruro de amonio (NH_4Cl Nro. CAS 12125-02-9)

8.4. Fosfato dibásico de sodio heptahidratado ($Na_2HPO_4.7H_2O$ Nro. CAS 7782-85-6)

8.5. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2)

8.6. Hipoclorito de sodio (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9)

8.7. Nitroprusiato de sodio (dihidrato nitroferricianuro sódico) ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$ Nro. CAS 13755-38-9)

8.8. Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$ Nro. CAS 7758-99-8)

8.9. Sulfato de potasio anhidro (K_2SO_4 N°CAS 7778-80-5)

8.10. Salicilato de sodio ($C_7H_5NaO_3$ N°CAS 54-21-7)

8.11. Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ Nro. CAS 6381-59-5)

8.12. **Solución de digestión**

En un matraz aforado de 1 L, con 700mL de agua 8.1, añadir 134,0g de sulfato de potasio y 134mL de ácido sulfúrico concentrado. Añadir 11,4 g de sulfato de cobre pentahidratado. Diluir hasta el aforo con agua 8.1 e invertir para homogeneizar. Mantener bien cerrado cuando no esté en uso para reducir la posibilidad de contaminación por amoníaco del ambiente. Preparar mensualmente.

8.13. **Buffer**

En un matraz Erlenmeyer de 1 L añadir 900mL de agua desionizada, 50g de tartrato de sodio y potasio, 50g de hidróxido de sodio y 26,8g de fosfato dibásico de sodio. Mezclar hasta disolver, hervir durante 10 minutos y enfriar hasta temperatura ambiente. Trasvasar a un matraz aforado de 1L, diluir hasta aforo e invertir para homogeneizar. Preparar mensualmente.

Nota 1: Para reducir la posibilidad de que el buffer esté contaminado a causa de los reactivos, se recomienda hervir este reactivo por 10 minutos. Para verificar que el buffer de tartrato es lo suficientemente puro, comparar la línea base de reactivo con la línea base de agua, la diferencia existente entre ella no debe superar los 0,15 V.

8.14. **Nitroprusiato – Salicilato**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1L disolver 150,0g de salicilato de sodio y 1,00g de nitroprusiato de sodio en aproximadamente 800mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar. Almacenar la solución en un frasco ámbar y preparar mensualmente o cuando la solución desarrolle un color azul – verdoso.

Preparación por Peso:

En un matraz Erlenmeyer de 1L agregar 150,0g de salicilato de sodio y 1,00g de nitroprusiato de sodio en 908g de agua 8.1. Agitar hasta disolución. Almacenar en un frasco ámbar y preparar mensualmente o cuando la solución desarrolle un color azul – verdoso.

8.15. **Hipoclorito de sodio**

Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 250mL, diluir 25,0mL de hipoclorito de sodio al 5,25 % hasta el aforo. Invertir para homogeneizar. Preparar diariamente.

Preparación por Peso:

En un matraz de 250mL, agregar 26,7 g de hipoclorito de sodio al 5,25% y 225 g de agua 8.1. Agitar para homogeneizar. Preparar diariamente.

8.16. **Solución estándar de Nitrógeno total Kjeldahl de 500 mg N/L:**

En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,90 g de cloruro de amonio que es previamente secado durante dos horas a 110 °C en aproximadamente 800mL de agua desionizada. Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar.

8.17. **Solución control de Nitrógeno total Kjeldahl de 500 mg N/L:**

En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,90 g de cloruro de amonio que es previamente secado durante dos horas a 110 °C en aproximadamente 800mL de agua desionizada. Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar.

Nota 2: El reactivo utilizado para preparar la solución estándar como la solución control debe ser de marcas distintas o por lo menos con números de lotes distintos.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Las muestras no deben consumir más del 10 % del ácido sulfúrico durante la digestión. Este consumo de ácido se puede detectar cuando se mide la densidad de la muestra digerida y se encuentran diferencias significativas entre las densidades. En caso de que esto ocurra, evaluar la posibilidad de repetir la muestra realizando una dilución mayor o estandarizar la muestra digerida con una solución de hidróxido de sodio, determinando así el excedente de ácido sulfúrico consumido en la digestión. Luego de realizada la estandarización, es necesario reanalizar la muestra con una dilución mayor.

9.2. Las digestiones deben estar libres de turbidez. Las piedras de ebullición pueden causar cierta turbidez. Para evitar que esto ocurra, hacer la toma para la medición del sobrenadante.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar al menos 7 de los siguientes estándares de acuerdo a la tabla utilizando una balanza de resolución de 0,001 g, a partir de un estándar de 100 mg N/L, preparado a partir de un material de referencia certificado o de la solución 8.16.

Masa estándar (g)	Masa final (g)	Concentración aprox. (mgN/L)
0.125	50	0.25
0.375	50	0.75
0.75	50	1.5
2.5	50	5.0
5.0	50	10.0
8.75	50	17.5
12.5	50	25.0
17.5	50	35.0
18.75	50	37.5
22.5	50	45.0
25.0	50	50.0
27.5	50	55.0

10.2. Preparar soluciones control para el chequeo de la curva de calibración a partir de un material de referencia certificado o a partir de la solución 8.17, de acuerdo a las siguientes diluciones.

Concentración estándar (mgN/L)	Masa estándar (g)	Masa final (g)	Concentración control curva (mgN/L)
500	0.5	25	10
500	2.5	25	50

Nota 3: Se asume una densidad de 1 g/mL.

Nota 4: Se sugiere preservar los estándares de la curva, blancos y controles con 2mL/L de H_2SO_4 concentrado. Estos pueden ser almacenados por 28 días una vez que hayan sido preservados, de lo contrario, preparar las diluciones correspondientes nuevamente.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Digestión de la muestra (muestra, estándares de curva de calibración, blancos y controles de calidad)

Determinar la humedad a una porción de muestra según la normativa técnica 1050UY y registrar los datos en la ruta de análisis RFQ 36.

Pesar el tubo de digestión conteniendo piedras de ebullición en cantidad suficiente, registrar el peso del tubo en el RFQ 39.

Sin tarar la balanza, realizar una toma de otra porción de la muestra de ensayo en base húmeda que contenga entre 0,2 a 0,5 g de materia seca. Registrar el peso del tubo más la muestra en el RFQ 39. Agregar en cada tubo 10mL de solución de digestión y homogeneizar con la ayuda de un vórtex con el objetivo de que se integre bien la muestra con los reactivos.

Colocar los tubos en el digestor Lachat BD-40, encender el equipo y seleccionar el programa NTK-MS. Verificar que las condiciones de digestión sean las siguientes: Paso 1 a 160 °C t rampa 30 minutos, t estable 60 minutos. Paso 2 a 390 °C t rampa 60 minutos, t estable 150 minutos.

Finalizada la digestión, retirar los tubos del digestor y dejarlos enfriar, antes de pasados los 10 minutos, agregar una pequeña cantidad de agua (según ES 01) en cada tubo para evitar la formación de material sólido en el fondo de éstos.

Cuando los tubos alcancen temperatura ambiente, llevar a 25mL con agua (según ES 01) y registrar el peso del tubo en RFQ 39. Homogeneizar utilizando vórtex. Dejar reposar las muestras digeridas por al menos 2 horas.

Los estándares de la curva al igual que los controles de la misma deben ser digeridos bajo las mismas condiciones recién descriptas y realizando una toma de 25mL de cada solución.

Realizar dos blancos sustituyendo la toma de muestra de sólido por 25mL de agua (según ES 01), y proseguir de la misma manera que las muestras sólidas.

Medir la densidad de todos los digeridos obtenidos (estándares de curva, blancos, controles y muestras) pesando 1,0mL de digerido con pipeta automática calibrada. Registrar el peso en RFQ 39.

$$Mh(g) = \frac{MR(g)}{(1-(\%Humedad/100))}$$

M_h: masa húmedo a tomar

M_R: Peso de materia Requerido (0,2g)

% Humedad: Porcentaje de humedad

Nota 5: Los estándares de la curva de calibración tienen una vigencia de 28 días luego de la digestión.

11.2. **Determinación instrumental**

Encender el equipo de inyección de flujo.

Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua (según ES 01) y hacer circular por todo el sistema unos minutos.

Introducir uno a uno y en el orden que aparece en el Manifold, cada línea de reactivos en el recipiente del reactivo correspondiente y dejar estabilizar por 10 minutos.

Realizar una alícuota de cada digerido, previamente filtrado con un filtro de 0.45µm, en caso de que la muestra digerida siga presentando turbidez y colocarlo en el tubo del rack del autosampler, después de haber colocado los estándares de curva (menor a mayor concentración), controles y blancos.

Verificar en el programa, en el icono de la configuración del instrumento, que esté seteado correctamente el modelo del rack del autosampler que se está utilizando, y que la temperatura para desarrollo de color sea la correcta (60 °C).

Ingresar en el programa de control del sistema, la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.

Iniciar la secuencia de análisis, una vez completada el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

Luego de finalizar con la determinación instrumental, se apaga el detector y se vuelven todas las líneas de reactivos al recipiente con agua dejando circular al menos 10 minutos y hasta verificar que la temperatura del calefactor haya alcanzado la temperatura ambiente. Por último, se dejan secar todas las líneas unos minutos haciendo circular aire por las mismas.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (señal en función de la concentración), y calcula la concentración de los controles y muestras.

Comprobar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no exista ninguna anomalía en la secuencia.

Generar el reporte de la secuencia y guardarlo en la carpeta correspondiente.

Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a las tomas de muestras, densidades y factores de corrección por humedad.

$$[NTK]_{BASE\ SECA}\ (mgN/kg) = \frac{[NTK]_{CURVA}\ (mg/L) \times M_{DIG}(g)}{m_{MUESTRA\ HÚMEDA}\ (g) \times F_{CORRECCIÓN\ HUMEDAD}}$$

Nota 6: Aunque el programa utilizado construya automáticamente la curva de calibración, se debe verificar que la misma tenga un coeficiente de correlación que cumpla con el criterio de aceptación definido (R^2 > 0,995) y que la curva con los puntos elegidos cubran el rango de concentración de la muestra, volver a integrar todos los picos de la corrida con la nueva calibración.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** Si se dispone de un material de referencia certificado sólido, en la secuencia de inyección del equipo, ubicarlo luego de los controles de chequeo de curva de calibración o al final de la corrida o ambas. Obtener el resultado del porcentaje a partir de la planilla de cálculo electrónica, comprobando así que cumpla con el criterio de aceptación 80 % – 120 %, hasta obtener datos suficientes para elaborar un gráfico de control. Si algún valor no cumple con los criterios de calidad establecidos, proceder según el Manual de Control de Calidad Analítico.

13.2. **Control de la precisión:** Debido a la heterogeneidad de las muestras analizadas en este procedimiento, se deben analizar las mismas todas por duplicado. El rango normal calculado para las muestras debe estar bajo control, siendo 20% el valor máximo aceptado de dispersión hasta la obtención de datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún valor no cumple con los criterios de calidad establecidos, proceder según el Manual de Control de Calidad Analítico.

Control de porcentaje de recuperación: Realizar una fortificación de cada muestra analizada, agregando a la toma realizada de muestra para la digestión, 250 µL de una solución de 1000 mg N/L o 500 µL de una solución de 500 mg N/L. El porcentaje de recuperación debe estar en el rango 80 – 120 %, hasta que se obtengan datos suficientes para elaborar un gráfico de control. Si algún valor no cumple con los criterios de calidad establecidos, proceder según el Manual de Control de Calidad Analítico.

Nota 7: A los efectos de reporte de resultados se debe cumplir al menos uno de los dos controles (precisión o porcentaje de recuperación).

13.3. **Control para chequeo de la curva de calibración:** Las soluciones control descriptas en el punto 10.2 deben cumplir con el criterio de aceptación de porcentaje de recuperación igual a 90 % - 110 %.

13.4. **Control de blancos:** Al menos uno de los dos blancos analizados debe tener una señal inferior a la señal correspondiente al límite de detección instrumental (< 2,5 V.s).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Norma UNE-EN 13342: Caracterización de lodos. Determinación de nitrógeno Kjeldahl.

14.2. EPA Method 1688: Total Kjeldahl Nitrogen in Water and Biosolids by Automated Colorimetry with Preliminary Semi-automatic Digestion (DRAFT January 2001).

14.3. LACHAT QuickChem Method 10-107-06-2-P, Determination of Total Kjeldahl Nitrogen by Flow Injection Analysis Colorimetry (Copper catalyst/Block digestor method).

14.4. Manual de Técnicas Analíticas para la Determinación de Parámetros Fisicoquímicos y Contaminantes Marinos (Aguas, Sedimentos y Organismos) – Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR).

4093UY

Determinación de nitrato mediante kit en aguas naturales y efluentes industriales

Elaborado - J. Martínez, V. Croce

Modificado - J. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrato (NO_3) en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales. Mediante este procedimiento se puede determinar la concentración de nitrato en un rango lineal de 0,5 a 22 mg N/L. Puede ampliarse el valor superior, por diluciones de la muestra, hasta 220 mg N/L (obtenido por dilución máxima validada 1/10). Tener en cuenta el límite de cuantificación a la hora de definir si esta técnica es adecuada para muestras de aguas naturales en cuestión.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAEA.

2.5. Instructivo de uso balanzas (INE 06, INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 115 e INE 94).

2.6. Ruta de análisis de nitrato (RFQ 55).

2.7. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 82, INE 109, INE 121).

2.8. Instructivo de uso del Espectrofotómetro FQ 692 (INE146).

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La reacción utiliza 2,6-dimetilfenol en una mezcla de ácido sulfúrico y ácido fosfórico. La nitración directa del dimetilfenol da lugar a la formación de 4-nitro-2,6-dimetilfenol, dependiendo del contenido en nitratos de la muestra.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Se presentan a continuación las interferencias y sus concentraciones mínimas en las que interfieren. No se ha comprobado el efecto sumado de distintos iones de interferencia.

NO_2^-	1 mg/L
Cl_2	10 mg/L
Zn^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}	50 mg/L
Ca^{2+}	250 mg/L
Cl	500 mg/L
CO_3^{2-}	1000 mg/L
DQO	2000 mg/L

5.2. A pesar de que en muestras ambientales no es habitual la presencia de nitrito, dicho anión interfiere a concentraciones > 1mg/L y se debe destruir antes del análisis añadiendo 1 cuchara medidora de ácido amidosulfúrico a 10mL de la muestra. Esperar 10 minutos antes de continuar con la determinación.

5.3. El método es aplicable en muestras con salinidad <0,5‰.

5.4. La turbidez provoca valores de medición más altos por lo que en estos casos, puede diluirse.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Se requiere al menos 250 mL de muestra para realizar el análisis.

6.2. Se debe filtrar las muestras con filtros de 0,45 µm para reducir su turbidez.

6.3. Realizar el análisis dentro de las 48 horas de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,001 g.

7.2. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 - 10,00) mL, (20 – 100) µL y (100 – 1000) µL.

7.3. Matraces Erlenmeyer de 150 ó 250 mL.

7.4. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL o 1000 mL.

7.5. Bomba de vacío.

7.6. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro.

7.7. Espectrofotómetro para uso a 350 nm.

8. REACTIVOS

8.1. Kit para determinación de nitrato Macherey-Nagel 985064.

8.2. Agua desionizada (grado 2, según ES 01).

8.3. Solución Control de Nitrato (200 mg N/L): En un matraz aforado de 1 L de capacidad, disolver 1.444 g ± 0.0005 g de KNO_3 (KNO_3 Nro. CAS 7757-79-1) en aproximadamente 600 mL de agua 8.1. Agregar 2 mL de cloroformo ($CHCl_3$ Nro. CAS 67-66-3). Diluir hasta el aforo e invertir para homogeneizar. Esta solución es estable durante 6 meses.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1 Enjuagar el material de vidrio con agua destilada hasta ausencia de amonio. No emplear detergentes.

9.2 Limpiar el exterior del tubo de ensayo previo a realizar la medida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La calibración de la técnica es proporcionada desde la fábrica, por lo que no aplica este punto en el procedimiento.

10.2. En caso de utilizar un kit que no es de la misma marca que el espectrofotómetro, realizar una curva de calibración.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Pipetear 0,5 mL de muestra en el tubo de reacción del kit. Agregar 0,5 mL del reactivo R2. Tapar el tubo de reacción e invertirlo 3 veces. Dejar en reposo 10 minutos y medir a 350 nm.

11.2. Registrar los datos obtenidos en la RFQ 55 luego de la determinación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración del kit está representada por la siguiente curva lineal:

$$Abs = a \times (mg\ NO_3^- - N/L) + b$$

donde:

a y b corresponden a la pendiente y ordenada en el origen, respectivamente.

La concentración de nitrato se calcula según la siguiente ecuación:

$$NO_3^-(mg\ NO_3^- - N/L) = (Abs - b)/a \times FD$$

donde:

FD corresponde al factor de dilución de la muestra.

Los resultados se expresan en mg NO_3^- - N/L

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** analizar la solución control simultáneamente con las muestras. Se debe utilizar una dilución de la solución control que se encuentre dentro del rango de trabajo del kit y proceder como si fuese una muestra más.

13.2. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada 5 muestras de aguas y uno cada 3 muestras de efluentes, o al menos uno por serie de muestras Se aceptará hasta 10% de rango normalizado hasta no contar con el gráfico de control correspondiente.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Se realizarán fortificaciones (con la solución control) en todas las muestras de efluentes industriales y en aquellas otras muestras que se sospeche interferencia de la matriz. Se aceptará una recuperación entre 80-120% del fortificado hasta no contar con gráficos de recuperación de la fortificación.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ISO 23696-1 Determination of nitrate in water using small-scale sealed tubes (análogo a ISO 7890-1, DIN 38405-D9)

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Nitrogen (Nitrate) 4500-NO3- A Introduction. pp. 433 a 434.

14.3. U.S. Environmental Protection Agency. In: Ohrel RL, Register KM, eds. Volunteer Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual., 2nd ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; 2006. Chapter 14: Salinity. EPA-842-B-06-003. pp. 14-1 a 14-8.

4094UY

Determinación de nitrito mediante kit en aguas naturales

Elaborado - J. Martínez, V. Croce

Modificado - J. Martínez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrito (NO_2^-) en aguas naturales. Mediante este procedimiento se puede determinar la concentración de nitrito en un rango de 0,015 – 0,46 mg N/L. Puede ampliarse el valor superior, por diluciones de la muestra, hasta 4,6 mg N/L (obtenido por dilución máxima validada 1/10).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Instructivo de uso balanzas (INE 06, INE 15, INE 16A, INE 16B, INE 115 e INE 94)

2.6. Ruta de análisis de nitrito (RFQ 56)

2.7. Instructivo de uso de destilador y desionizador de agua (INE 82, INE 109, INE 121)

2.8. Instructivo de uso del Espectrofotómetro FQ 692 (INE146)

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El ácido sulfanílico se diazotiza mediante nitrito en una solución ácida. La sal de diazonio que se forma se acopla a continuación con 1-naftilamina para formar un colorante azoico rojo, que se determina fotométricamente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Interfieren el cloro libre, los coloides orgánicos y los ácidos húmicos.

5.2. No interfieren: ≤ 3 mg/L Fe (III), Cr (VI).

5.3. La turbidez provoca valores de medición más altos por lo que debe diluirse la muestra, previo al análisis.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente). Se requiere al menos 250 mL de muestra para realizar el análisis. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C).

6.2. Filtrar las muestras con filtros de 0,45 µm para reducir su turbidez.

6.3. Realizar el análisis dentro de las 48 horas de realizado el muestreo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza de resolución 0,001 g.

7.2. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 - 10,00) mL, (20 – 100) µL y (100 – 1000) µL.

7.3. Matraces Erlenmeyer de 150 ó 250 mL.

7.4. Equipo de filtración compuesto por: embudo Büchner, con portafiltro de 47 mm de diámetro y frasco de succión de 250 mL o 1000 mL.

7.5. Bomba de vacío.

7.6. Filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro.

7.7. Espectrofotómetro para uso a 540 nm.

8. REACTIVOS

8.1. Kit para determinación de nitrito Macherey-Nagel 985068.

8.2. Agua desionizada (grado 2, según ES 01).

8.3. Solución Control de Nitrito: se puede utilizar material de referencia certificado, de concentración 1000 mg NO_2/L (304,46 mg N/L).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1 Enjuagar el material de vidrio con agua destilada hasta ausencia de amonio. No emplear detergentes.

9.2 Limpiar el exterior del tubo de ensayo previo a realizar la medida.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La calibración de la técnica es proporcionada desde de fábrica, por lo que no aplica este punto en el procedimiento.

10.2. En caso de utilizar un kit que no sea de la misma marca que el espectrofotómetro, realizar una curva de calibración.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Pipetear 4,0 mL de muestra en el tubo de reacción del kit. Agregar 0,2 mL del reactivo R2. Tapar el tubo de reacción y mezclar. Dejar en reposo 10 minutos y medir a 540 nm.

11.2. Registrar los datos obtenidos en la RFQ 56 luego de la determinación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La curva de calibración del kit está representada por la siguiente curva lineal:

$$Abs = a \times (mg\ NO_2^- - N/L) + b$$

donde:

a y b corresponden a la pendiente y ordenada en el origen, respectivamente.

La concentración de nitrito se calcula según la siguiente ecuación:

$$NO_2^-(mg\ NO_2^- - N/L) = (Abs - b)/a \times FD$$

dónde:

FD corresponde al factor de dilución de la muestra.

Los resultados se expresan en mg NO_2^- - N/L

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de la exactitud:** analizar la solución control simultáneamente con las muestras. Se debe utilizar una dilución de la solución control que se encuentre dentro del rango de trabajo del kit y proceder como si fuese una muestra más.

13.2. **Control de la precisión:** Realizar un duplicado cada 5 muestras de aguas, o al menos uno por serie de muestras. Se aceptará hasta 10% de rango normalizado hasta no contar con el gráfico de control correspondiente.

13.3. **Porcentaje de recuperación:** Realizar un fortificado cada 5 muestras de aguas, o al menos uno por serie de muestras. Se aceptará una recuperación entre 80-120% del fortificado hasta no contar con gráficos de recuperación de la fortificación.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manual de kit Macherey-Nagel Nanocolor Nitrito 2 (REF 985068).

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Nitrogen (Nitrite) 4500-NO2- A Introduction, B Colorimetric Method. pp. 449 a 451.

SECCIÓN 5
Microbiológicos

5053UY

Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales

Técnica de filtración por membrana

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales, superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas. Es aplicable también a aguas salobres o salinas. El límite de cuantificación es de 20 ufc/ 100 mL; el límite de detección es de 3 ufc/100 mL.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento: “Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista”. (5072 UY).

2.7. Procedimiento: “Técnica de incubación tardía para la determinación de coliformes totales y termotolerantes por membrana filtrante” (5065UY).

2.8. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02).

2.9. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13, INE 86 y INE 97).

2.10. Instructivo de uso balanza (INE 16C).

2.11. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17).

2.12. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.13. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).

2.14. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44).

2.15. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87).

2.16. Rutas de análisis (RMB 01).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El grupo de bacterias coliformes termotolerantes para la técnica de filtración por membrana se define como todos los bacilos gram negativos, aeróbicos y algunos anaeróbicos facultativos, no formadores de endosporas, que cuando se incuban en medio M-FC por 24 h ± 2 h a 44,5 °C ± 0,2 °C desarrollan colonias color azul.

3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 44,5 °C por 24 h. Este medio selectivo y la temperatura de incubación disminuyen el desarrollo de bacterias no coliformes que afectarían negativamente el crecimiento de los coliformes termotolerantes.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Realizar la preparación del medio de cultivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.

4.2. El análisis y el recuento deben ser realizados en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.3. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Aguas con gran turbidez pueden hacer que el filtro quede colmatado con sólidos e inhibir el crecimiento bacteriano.

5.2. Aguas con alta densidad de bacterias no coliformes; si se detecta interferencia por bacterias heterótrofas, se debe repetir el muestreo.

5.3. Aguas con niveles altos de metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos como fenoles, pueden verse concentrados en el filtro e inhibir el crecimiento de las bacterias coliformes.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar durante el muestreo.

6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Si por razones no es esto viable, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 10°C (> 0 °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, referirse al procedimiento normalizado de operación 5065UY.

6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $Na_2S_2O_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual.

Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34 - 51 KPa.

7.2. Balanzas de resolución 0,01 g

7.3. Baño de agua o incubadora a 44,5 °C ± 0,2 °C

7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10x a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80 °C con la placa (de preferencia).

7.5. Autoclave

7.6. Mecheros

7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado para los filtros (7.8).

7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadriculados estériles de 0,45 µm ± 0,02 µm de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.

7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.

7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.

7.11. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.

7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.

7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.

7.14. Heladera a 2-8 °C.

7.15. Asas bacteriológicas

7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia)

7.17. Plancha calefactora o baño maría

7.18. Cinta de revelado de autoclave

7.19. Desionizador de agua

7.20. pHímetro (analizador de iones)

7.21. Agitador vórtex

7.22. Papel de embalaje

7.23. Bolsas herméticas (si se utiliza baño de agua para incubar las placas de Petri)

8. REACTIVOS

8.1. Peptona (Difco, u Oxoid)

8.2. Medio de cultivo M-FC Agar (Difco, u Oxoid)

8.3. Ácido Rosólico (Nº CAS 603-45-2)

8.4. Hidróxido de sodio 0.2N

8.5. Agua desionizada (según ES 01)

8.6. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico

8.7. Alcohol etílico.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada o desionizada y esterilizado.

9.2. Las placas de Petri deben ser estériles.

9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo a su utilización.

9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad, también es posible utilizar cámara de flujo laminar.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.

11.2. Precintar la tapa del recipiente y colocar cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días. Rotular indicando fecha de esterilización.

Preparación del medio de cultivo

11.4. El medio de cultivo debe prepararse utilizando agua desionizada y material de vidrio estéril. Calentar hasta casi ebullición para disolver el agar, agregar ácido rosólico al 1% preparada en NaOH 0.2N en una proporción de 10mL en 1000mL de medio preparado, llevar nuevamente hasta casi ebullición y luego dejar enfriar entre 45 – 50°C aprox. antes de repartir en placas. No autoclavar. El pH final del medio de cultivo debe ser 7,4 ± 0,2. El agregado de ácido rosólico es para suprimir el crecimiento de flora acompañante, por lo que es recomendado principalmente para el análisis de efluentes. Confirmar este proceso según instrucciones del fabricante.

11.5. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período de 90 días en Erlenmeyer, o frasco con tapón cerrado.

Preparación de las placas de Petri

11.6. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatizarlo a 45°C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.

11.7. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.

11.8. Almacenar en heladera de material estéril entre 2-8 °C hasta su utilización, como máximo 14 días.

Preparación de tubos para diluciones

11.9. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.

11.10. Colocar 9mL ± 0,2mL de agua desionizada en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel de embalaje.

11.11. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Rotular indicando fecha de esterilización.

11.12. Conservar en heladera de material estéril (2-8°C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

11.13. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1mL de muestra o de la dilución previa, a los 9mL de agua desionizada. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra, es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.

11.14. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadriculada hacia arriba, sobre el portafiltros poroso del embudo, utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.

11.15. Filtrar un volumen aproximado a 10mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.

11.16. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vórtex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.

11.17. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadriculada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire si es necesario. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.

11.18. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.

11.19. Si el volumen a filtrar es poco, por ejemplo 1mL, colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.

11.20. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.

11.21. Incubar las placas de Petri en posición invertida totalmente sumergidas en el baño de agua a 44,5 °C ± 0,2 °C durante 24 h ± 2 h, Se puede utilizar bolsas herméticas, dejar la menor cámara de aire posible para que alcance rápidamente la temperatura.

Recuento

11.22. Las colonias típicas de coliformes termotolerantes son de distintas tonalidades de azul. Las colonias grises o crema son consideradas como no coliformes, aunque existen colonias de *E. coli* atípicas que se presentan de color crema por lo que se recomienda realizar la verificación a posteriori.

11.23. El recuento de colonias se realiza, de ser posible, en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo. Si fuera necesario se puede realzar utilizado equipo de recuento (7.4).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$\text{C. termotolerantes (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de coliformes contadas x 100}}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc corresponde a Unidades Formadoras de Colonias

12.2. Si el número de colonias típicas de coliformes termotolerantes fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto. Informar como recuento estimado.

12.3. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.

- Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
- Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

En ambos casos informar como recuento estimado.

12.4. Si el recuento es cero, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de coliformes termotolerantes, y expresar los resultados como < valor obtenido. Si el resultado es menor a 20 ufc/100 mL, expresar como < LC (límite de cuantificación).

12.5. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15x100)}{50} = \text{estimado 30 coliformes /100 mL}$$

12.6 Si el número de colonias a contar es mayor a 60, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 10,1 y 0,1 mL, y el conteo es muy alto y no se puede contar (NSPC), 150 y 92 colonias respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{92 \text{ x } 100}{0,1} = \text{estimado 92.000 coliformes /100mL}$$

12.7 Si se filtra por ejemplo 1.0, 0.3, 0.1 y 0.03mL con recuentos NSPC, NSPC, 58 y 21 respectivamente, se toman en cuenta los 2 valores dentro de rango y el resultado es el siguiente:

$$\frac{(58+21) \text{ x } 100}{(0,1+0,03)} = 61.000 \text{ coliformes /100mL}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:**

- Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.
- Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control y registro de temperatura de la incubadora con termómetro calibrado).

- Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.
- Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas en el Sector, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el Procedimiento Normalizado de Operación para la Verificación de coliformes termotolerantes 5072UY. Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como coliformes termotolerantes verificados. Si no es posible hacer las verificaciones en el momento, aislar las colonias en agar de soja tríptica (TSA) y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo valor de precisión rápidamente; también es un criterio válido calcularlo de forma anual con la totalidad de muestras analizadas en el sector para cada matriz ambiental. Una vez que está establecido el valor de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al sector cada día, por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido. Construir el gráfico de control de precisión correspondiente.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10%.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9020B Intralaboratory Quality Control Guidelines, 9050B Water pp. 1093, 9060 Samples pp.1094, Method 9222D Thermotolerant (Fecal) Coliform Membrane Filter Procedure pp. 1153-1156.

5054UY

Determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales

Técnica de filtración por membrana

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas. El límite de cuantificación es de 20 ufc/100 mL, y el límite de detección es de 3 ufc/100 mL.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento: “Control de calidad analítico para verificar coliformes totales determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista˝ (5071UY).

2.7. Procedimiento: “Técnica de incubación tardía para la determinación de coliformes totales y termotolerantes por membrana filtrante” (5065UY).

2.8. Instructivo de uso de bomba de vacío (INE 02).

2.9. Instructivo de uso de autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.10. Instructivo de uso de balanza (INE 16C).

2.11. Instructivo de uso de cámara de flujo laminar (INE 17).

2.12. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121).

2.13. Instructivo de equipo analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98).

2.14. Instructivo de uso de agitador vórtex (INE44).

2.15. Instructivo de uso de incubadora (INE 46).

2.16. Ruta de análisis (RMB 02).

2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El grupo de bacterias coliformes para la técnica de filtración por membrana se define como todos los bacilos gram negativos, aeróbicos y algunos anaeróbicos facultativos, no formadores de endosporas, que cuando se incuban en medio m-Endo Agar por 22 - 24 h a 35 °C ± 0,5 °C desarrollan colonias color rojo con brillo verde metálico. Estas bacterias fermentan la lactosa formando un aldehído como compuesto intermediario, el cual forma un complejo con la fucsina y el sulfito de sodio presente en el medio, les da a las colonias su coloración característica.

3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo a 35°C por 22 - 24 h. La incorporación en el medio de cultivo de determinados colorantes, permite que la producción de ácido y aldehído debido a la fermentación de la lactosa se visualice por la formación de colonias rojas con brillo verde metálico, típicas de coliformes totales

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El medio de cultivo m-Endo Agar, contiene el colorante fucsina con posibles efectos carcinogénicos y mutagénicos, por lo que se debe evitar contacto con la piel, mucosas, así como evitar su inhalación.

4.2. Realizar la preparación del medio de cultivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.

4.3. El análisis y el recuento deben ser realizados en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.4. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Aguas con gran turbidez pueden hacer que el filtro quede colmatado con sólidos e inhibir el crecimiento bacteriano.

5.2. Aguas con alta densidad de bacterias no coliformes; si se detecta interferencia por bacterias heterótrofas, se debe repetir el muestreo.

5.3. Aguas con niveles altos de metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos como fenoles, pueden verse concentrados en el filtro e inhibir el crecimiento de las bacterias coliformes.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar.

6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 10 °C (>0 °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h. Para efluentes industriales es de 8 horas. Cuando sea necesario realizar la modificación de la técnica estándar de filtración por membrana, referirse al procedimiento normalizado de operación 5065UY.

6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $Na_2S_2O_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual.

Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que se puedan trabar entre sí y sean autoclavables; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34 - 51 KPa

7.2. Balanzas de resolución 0,01 g

7.3. Incubadora a 35,0 °C ± 0,5 °C

7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10x a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80° con la placa (de preferencia)

7.5. Autoclave

7.6. Mecheros

7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado para los filtros (7.8)

7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadriculados estériles de 0,45 µm ± 0,02 µm de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47mm de diámetro

7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas

7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca

7.11. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL) y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas

7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.

7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora

7.14. Heladera a 2-8°C

7.15. Asas bacteriológicas

7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia)

7.17. Plancha calefactora o baño maría

7.18. Cinta de revelado de autoclave

7.19. Desionizador de agua

7.20. pHímetro (analizador de iones)

7.21. Agitador vórtex

7.22. Papel de embalaje

8. REACTIVOS

8.1. Peptona (Difco, u Oxoid)

8.2. Etanol 95 % (CH_3CH_2OH Nro. CAS 64-17-5)

8.3. Medio de cultivo m-Endo Agar LES (Difco, u Oxoid)

8.4. Fucsina básica (BR50), o similar según especificaciones del medio utilizado.

8.5. Agua desionizada (según ES 01)

8.6. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico.

8.7. Alcohol etílico.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico debe estar lavado, enjuagado con agua destilada o desionizada y esterilizado.

9.2. Las placas de Petri de plástico deben estar estériles.

9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo a su utilización.

9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad, también es posible utilizar cámara de flujo laminar.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1%

11.1. Adicionar 1 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.

11.2. Precintar la tapa del recipiente y colocar cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días. Rotular indicando fecha de esterilización.

Preparación del medio de cultivo

11.4. El medio de cultivo debe prepararse según instrucciones del fabricante en el envase, utilizando agua desionizada y material de vidrio estéril. Calentar hasta casi ebullición para disolver el agar, agregar 12mL en 1000mL de medio de una solución de fuscina básica (BR50) al 10% en 50:50 etanol/agua destilada y luego dejar enfriar entre 45 – 50 ˚C antes de repartir en placas. No autoclavar. El pH final del medio de cultivo debe ser 7,2 ± 0,2.

11.5. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período de 90 días en Erlenmeyer o frascos con tapón cerrado.

Preparación de las Placas de Petri

11.6. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatizarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.

11.7. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.

11.8. Almacenar en heladera de material estéril entre 2-8 °C hasta su utilización, como máximo 14 días.

Preparación de tubos para diluciones

11.9. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.

11.10. Colocar 9,0 mL ± 0,2 mL de agua desionizada estéril en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel embalaje.

11.11. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C. Rotular indicando fecha de esterilización.

11.12. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis de la muestra

11.13. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua desionizada estéril. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10 o las diluciones realizadas. Si no se dispone de valores históricos de la muestra, se recomienda filtrar tres volúmenes.

11.14. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadriculada hacia arriba, sobre el portafiltros poroso del embudo, utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.

11.15. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.

11.16. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vórtex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.

11.17. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadriculada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire si es necesario. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.

11.18. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.

11.19. Si el volumen a filtrar es poco por ejemplo 1 mL, colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.

11.20. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.

11.21. Incubar las placas de Petri en posición invertida, en la estufa de 35,0 °C ± 0,5 °C durante 22-24 h. Las aguas tratadas pueden contener microorganismos estresados que presentan crecimiento más lento, y demoran entre 22-24 h en manifestar el brillo verde metálico. En aguas naturales, las colonias típicas de coliformes pueden observarse entre las 16-18 h de incubación.

Recuento

11.22. Las colonias típicas de coliformes totales son aquellas rojas o rosado oscuro que presentan brillo verde metálico en la superficie ya sea como un pequeño punto o en toda la superficie de la colonia. Las colonias que no presentan brillo, pudiendo ser rojas, rosadas, blancas o sin color son consideradas como no coliformes.

11.23. El recuento de colonias se realiza, de ser posible, en las placas que contengan entre 20 y 80 colonias de coliformes típicas y no más de 200 colonias de cualquier tipo. Si fuera necesario se puede realzar utilizado equipo de recuento (7.4).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$\text{C. totales (ufc/100 mL)} = \frac{\text{colonias de coliformes contadas x 100}}{\text{mL de muestra filtrados}}$$

donde:

ufc: corresponde a Unidades Formadoras de Colonias

12.2. Si el número de colonias típicas de coliformes totales fuera entre 20 y 80 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto. Informar como recuento estimado.

12.3. Si el número de colonias típicas es mayor a 80, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación.

- Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
- Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

En ambos casos informar como recuento estimado.

12.4. Si el recuento es cero, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de coliformes totales, y expresar los resultados como < valor obtenido. Si el resultado es menor a 20 ufc, expresar como <LC (límite de cuantificación).

12.5. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y <1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15x100)}{50} = \text{estimado 30 coliformes /100 mL}$$

12.6. Si el número de colonias a contar es mayor a 80, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 10,1 y 0,1 mL, y el conteo es NSPC, 150 y 92 colonias respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{92 \text{ x } 100}{0,1} = \text{estimado 92.000 coliformes /100 mL}$$

12.7. Si se filtra por ejemplo 1.0, 0.3, 0.1 y 0.03mL con recuentos NSPC, NSPC, 78 y 21 respectivamente, se toman en cuenta los 2 valores dentro de rango y el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78+21) \text{ x } 100}{(0,1+0,03)} = 76.000 \text{ coliformes /100 mL}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:**

- Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de agua estéril e incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.
- Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control y registro de temperatura de la incubadora con termómetro calibrado).

- Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.
- Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas en el Sector, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el Procedimiento Normalizado de Operación para la Verificación de coliformes termotolerantes 5072UY. Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como coliformes termotolerantes verificados. Si no es posible hacer las verificaciones en el momento, aislar las colonias en agar de soja tríptica (TSA) y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el Criterio de Precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC 07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo valor de precisión rápidamente; también es un criterio válido calcularlo de forma anual con la totalidad de muestras analizadas en el sector para cada matriz ambiental. Una vez que está establecido el valor de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al sector cada día, por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido. Construir el gráfico de control de precisión correspondiente.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10%.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9020B Intralaboratory Quality Control Guidelines, 9050B Water pp. 1093, 9060 Samples pp.1094, Method 9222B Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure. pp. 1147 a 1152.

5055UY

Determinación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas naturales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales

Sustrato definido Colilert®-18

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales, y aguas residuales domésticas e industriales, obteniendo resultados en 18-22 horas, al incubar a 35 °C ± 0,5 °C.

1.2. Cuando se incuba a 44,5 °C ± 0,2 °C, se puede también determinar coliformes termotolerantes.

1.3. El límite de cuantificación, al igual que el límite de detección, es de 1 NMP/100 mL.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Instructivo de uso autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.7. Instructivo de uso balanza plato abierto (INE 16C).

2.8. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17).

2.9. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.10. Instructivo de uso sellador Quanti-Tray (INE 43).

2.11. Instructivo de uso de incubadora (INE 46).

2.12. Instructivo de uso baño de agua para incubación de coliformes termotolerantes (INE 87), en el caso que se quiera determinar este parámetro.

2.13. Ruta de análisis (RMB 05).

2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método consiste en agregar a 100 mL de la muestra líquida un reactivo específico, e incubar la misma durante 18-22 horas.

Cuando se incuba a 35 °C Colilert-18 detecta simultáneamente los coliformes totales y *E. coli* presentes en el agua. La identificación se basa en que cuando los coliformes totales, que presentan la enzima β-D-galactosidasa, metabolizan el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranósido) de Colilert-18, la muestra toma una coloración amarilla por la presencia de ortonitrofenol. Cuando *E. coli*, que presenta la enzima β-glucuronidasa, metaboliza el sustrato MUG (4-metilenbeliferin-β-D-glucurónido) la muestra fluoresce.

Cuando se incuba a 44,5 °C Colilert-18 detecta coliformes termotolerantes. El indicador ONPG produce coloración amarilla cuando es metabolizado por los coliformes termotolerantes a dicha temperatura.

3.2. Colilert-18 puede detectar estas bacterias a una concentración de 1 ufc/100 mL dentro de las 18 horas, hasta en presencia de 2 millones de bacterias heterotróficas por cada 100 mL.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Manipular el reactivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.

4.2. El análisis debe ser realizado en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.3. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Colilert-18 puede usarse para *E. coli* (pero no para coliformes) en aguas marinas. En este caso las muestras deben diluirse al menos 10 veces.

5.2. Los resultados deben ser leídos entre las 18 y 22 horas de incubada la muestra. Los positivos para coliformes totales y para *E. coli* o coliformes termotolerantes observados antes de las 18 horas y los negativos observados después de las 22 horas también son válidos.

5.3. Si la muestra de agua tiene un cierto color de fondo, comparar la muestra inoculada de Colilert-18 con un blanco testigo de la misma muestra de agua.

5.4. Colilert-18 es una prueba primaria del agua. Las características de rendimiento de Colilert-18 no se aplican a muestras alteradas por enriquecimiento o concentración previos.

5.5. En caso de muestras con exceso de cloro, tal vez se observe un destello azul al añadir Colilert-18. Si se observa, considerar que la muestra no es válida y suspender la prueba.

5.6. Las bacterias no coliformes como Aeromonas, Flavobacterias y Pseudomonas, producen pequeñas cantidades de la enzima β-D-galactosidasa, pero generalmente no producen reacción positiva a menos que se encuentren presentes a una concentración mayor a 10^6 ufc/100 mL. A su vez algunas cepas de *Shigella sp. y Salmonella sp.* también producen una respuesta de fluorescencia pero no cambian el color a amarillo ya que carecen de la enzima β-D-galactosidasa, por lo que también resultan negativas para *E.coli*.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar durante el muestreo.

6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 8°C (> 0 °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 horas. Para efluentes industriales es de 8 horas.

6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $Na_2S_2O_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual.

Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Bandeja de incubación estériles (Quanti-Tray, IDEXX).

7.2. Sellador de bandejas (Quanti-Tray Sealer Model 2X IDEXX).

7.3. Probetas de 100 mL estériles.

7.4. Estufa de incubación a 35 °C ± 0,5 °C (para coliformes totales y *E. coli*).

7.5. Baño de incubación a 44,5 °C ± 0,2 °C (para coliformes termotolerantes).

7.6. Lámpara UV 365 nm.

7.7. Recipientes estériles de vidrio o plástico con capacidad mínima de al menos 150 mL.

7.8. Ansas.

7.9. Autoclave.

7.10. Mecheros.

7.11. Pipetas automáticas de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles.

7.12. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.

7.13. Heladera a 2-8 °C.

7.14. Cámara de flujo laminar (de preferencia).

7.15. Cinta de revelado de autoclave.

7.16. Desionizador de agua (Millipore Elix Escentials o similar).

7.17. Balanza de resolución 0,01 g.

7.18. Papel de embalaje.

8. REACTIVOS

8.1. Reactivo Colilert-18 IDEXX (almacenar entre 2-25 ˚C en oscuridad).

8.2. Agua desionizada (ES 01).

8.3. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico.

8.4. Alcohol etílico.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Al iniciar el análisis limpiar la mesada con alcohol al 70% y trabajar entre dos mecheros encendidos o en cámara de flujo laminar para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

9.2. El material de vidrio y plástico que se emplee debe estar estéril.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua desionizada estéril

11.1. Adicionar 1000 mL de agua desionizada en una botella.

11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Rotular indicando fecha de esterilización

11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días. Rotular indicando fecha de esterilización

Análisis de la muestra

11.4. Termostatizar la muestra a temperatura ambiente y homogeneizar.

11.5. Añadir el contenido del reactivo Colilert-18 a 100 mL de muestra (o la dilución correspondiente) a temperatura ambiente, y en un recipiente estéril. En el caso de realizar diluciones, siempre llevar a 100 mL con agua desionizada estéril.

11.6. Tapar y agitar el recipiente hasta disolver.

11.7. Verter la mezcla de muestra + reactivo en una bandeja de incubación y sellar en el sellador Quanti-Tray de IDEXX.

11.8. Colocar la bandeja sellada en la incubadora a 35 °C ± 0,5 °C para determinación de coliformes totales y *E. coli*; o incubar a 44,5 °C ± 0,2 °C para la determinación de coliformes termotolerantes durante 18 -22 horas. Después de las 22 h los resultados negativos siguen siendo válidos, pero no así los resultados positivos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

Si la muestra fue incubada a 35 °C:

12.1. Contar el número de pocillos amarillos chicos y grandes. A continuación, con estos datos entrar en la tabla de doble entrada de Colilert-18 (Anexo) y obtener el valor que provenga de la intersección del número de pocillos chicos y grandes. Este valor corresponde al número más probable (NMP) de coliformes totales/100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente.

12.2. Para determinar el NMP de *E. coli* /100 mL buscar fluorescencia usando una luz de 6 vatios, y 365 nm a una distancia de unos 13 cm de la muestra en un ambiente oscuro. Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra. Contar el número de pocillos fluorescentes grandes y chicos y obtener el valor de la tabla de doble entrada (Anexo). El valor corresponde al NMP de *E. coli* /100 mL. En caso de haber diluido la muestra, realizar la corrección correspondiente.

Si la muestra fue incubada a 44,5 °C:

12.3. Contar el número de pocillos amarillos chicos y grandes. A continuación, con estos datos entrar en la tabla de doble entrada (Anexo) y obtener el valor que provenga de la intersección del número de pocillos chicos y grandes. Este valor corresponde al NMP de coliformes termotolerantes/100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente

En resumen, los resultados obtenidos pueden ser:

no amarillo y no fluorescente cuando se incuba a 35 °C o 44,5 °C	Negativo para coliformes totales, *E. coli* y coliformes termo-tolerantes
amarillo y no fluorescente cuando se incuba a 35 °C	Positivo para coliformes totales
amarillo y no fluorescente cuando se incuba a 44,5 °C	Positivo para coliformes termotolerantes
amarillo y fluorescente cuando se incuba a 35 °C	Positivo para *E. coli*

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Calidad del proceso analítico:

- Control de medios de cultivo: a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.
- Control del medio de cultivo cuando cambio el lote: se recomienda inocular 3 recipientes estériles conteniendo 100 mL de agua estéril con las siguientes cepas:

a) *E. coli* ATCC 25922 ó 11775

b) coliforme total diferente de *E.coli* (Ej: *Klebsiella pneumonae* 13883 ó 4352 , *Enterobacter cloacae*)

c) no coliforme (Ej: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 11700)

Los resultados obtenidos son:

no amarillo y no fluorescente cuando se incuba a 35 °C o 44,5 °C	*Pseudomona aeruginosa* (no coliforme)
amarillo y no fluorescente cuando se incuba a 35 °C	*Klebsiella pneumonae* (coliforme total)
amarillo y no fluorescente cuando se incuba a 35 °C o cuando se incuba a 44,5 °C	*Escherichia coli*

- Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis: Incubar 100 mL de agua desionizada estéril para comprobar esterilidad. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.
- Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control y registro de temperatura de la incubadora con termómetro calibrado).

13.2. **Control de la precisión:** Establecer el Criterio de precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC07). Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo valor de precisión rápidamente. Alternativamente se puede calcular de forma anual con la totalidad de muestras analizadas en el Sector para cada matriz ambiental. Una vez que está establecido el nuevo valor de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al Sector por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido. Con estos datos construir el gráfico de control de precisión correspondiente.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9223A Introduction, Method 9323B Enzyme substrate coliform test pp. 1163-1167.

14.2. IDEXX Colilert-18 and Quanti-Tray method for the detection of fecal coliform in wastewater. https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert-18/

5058UY

Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales

Técnica de filtración por membrana

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, filtrando un volumen determinado de la muestra, y obteniendo resultados en 24 horas.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento "Control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista" (5070UY).

2.7. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02).

2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.9. Instructivo de uso balanza (INE 16C).

2.10. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17).

2.11. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.12. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).

2.13. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44).

2.14. Instructivo de uso de incubadora (INE 46).

2.15. Rutas de análisis (RMB 06).

2.16. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los enterococos se encuentran comúnmente en las heces de los humanos y otros animales de sangre caliente. Aunque algunas cepas son ubicuas y no están relacionadas con la contaminación fecal, la presencia de enterococos en agua es indicativo de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos,

3.2. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa y su incubación en un medio de cultivo selectivo Indoxyl-β- D-Glucoside Agar (mEI) a 41 °C.

3.3. En este procedimiento, los enterococos se definen como todas aquellas bacterias que cuando se incuban en medio mEI por 24 horas a 41 °C ± 0,5 °C desarrollan colonias con un diámetro ≥ a 0,5 mm con un halo azul, sin importar el color de las colonias. El halo azul no debe estar incluido en la medida del diámetro de la colonia. El género enterococos incluye E. faecalis, *E. faecium, E. avium, E. gallinarium* y sus variantes. Este género incluye los enterococos que previamente estuvieron asignados al Grupo D de los estreptococos fecales.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El análisis y el recuento deben ser realizados en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.2. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Aguas con gran turbidez pueden hacer que el filtro quede colmatado con sólidos e inhibir el crecimiento bacteriano.

5.2. Aguas con alta densidad de otros microorganismos puede afectar el recuento y la identificación de las colonias de interés.

5.3. Aguas con niveles altos de metales tóxicos o compuestos orgánicos tóxicos como fenoles, pueden verse concentrados en el filtro e inhibir el crecimiento de los enterococos.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, y estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla.

6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 10 °C (> 0 °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 horas. Para efluentes industriales es de 8 horas.

6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $Na_2S_2O_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15mg/L de cloro residual. Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de filtración: embudo y portafiltro poroso que permitan trabarse entre sí y se puedan esterilizar; bomba de vacío; kitasato de 1 litro o mayor; trampa de agua entre el kitasato y la bomba de vacío. En lo posible, la presión de vacío sobre el filtro debe ser de 34-51 Kpa.

7.2. Balanzas de resolución 0,01 g.

7.3. Incubadora a 41 ± 0,5 °C.

7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10x a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80° con la placa (de preferencia).

7.5. Autoclave.

7.6. Mecheros.

7.7. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 47 mm de diámetro aproximadamente u otro tamaño adecuado para los filtros (7.8)

7.8. Filtros de nitrocelulosa cuadriculados estériles de 0,45 µm ± 0,02 µm de diámetro de poro, libre de glicerina y sin áreas hidrofóbicas, de 47 mm de diámetro.

7.9. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.

7.10. Tubos de ensayo de vidrio estériles para diluciones con tapa de algodón o de rosca.

7.11. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas

7.12. Material de vidrio estéril para preparación del medio de cultivo.

7.13. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.

7.14. Heladera a 2-8 °C.

7.15. Asas bacteriológicas.

7.16. Cámara de Flujo Laminar (de preferencia).

7.17. Plancha calefactora o baño maría.

7.18. Cinta de revelado de autoclave.

7.19. Desionizador de agua.

7.20. pHímetro (analizador de iones).

7.21. Agitador vórtex

7.22. Papel de embalaje.

8. REACTIVOS

8.1. Cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5)

8.2. Fosfato de sodio monobásico anhidro (NaH_2PO_4 Nro. CAS 10049-21-5)

8.3. Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4 Nro. CAS 7558-79-4)

8.4. Tripticasa soja agar (TSA)

8.5. Medio de cultivo mE Agar (Difco, u Oxoid)

8.6. Ácido nalidíxico ($C_{12}H_{12}N_{2O}$ Nro. CAS 389-08-2)

8.7. Triphenyl tetrazolium chloride (TTC $C_{19}H_5ClN_2$ Nro. CAS 298-96-4)

8.8. Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS. 1310-73-2) 0,1 N

8.9. Indoxyl-β-D-glucoside ($C_{14}H_{17}NO_6$ Nro. CAS 487-60-5)

8.10. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico.

8.11. Agua desionizada (ES 01)

8.12. Alcohol etílico.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El material de vidrio que se emplee en la realización del medio de cultivo, así como en el procedimiento analítico, debe estar lavado, enjuagado con agua destilada o desionizada y esterilizado.

9.2. Las placas de Petri de plástico deben estar estériles.

9.3. Los punteros de las pipetas automáticas y los embudos de filtración deben ser esterilizados previo a su utilización.

9.4. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener las condiciones de esterilidad, también es posible utilizar cámara de flujo laminar.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas.

Preparación de Buffer Fosfato Salino (PBS)

11.1. Disolver agitando 0,58 g de NaH_2PO_4, 2,5 g de Na_2HPO_4 y 8,5 g de NaCl en 1000mL de agua desionizada

11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días. Rotular indicando fecha de esterilización.

Preparación del medio de cultivo mEI.

11.4. Agregar 71,2 g del medio deshidratado mE y 0,75 g de indoxyl-β-D glucoside a 1 litro de agua desionizada, y calentar hasta que los ingredientes se disuelvan. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos, y posteriormente enfriar a aproximadamente 45 °C.

11.5. Luego de la esterilización: mezclar 0,24 g de ácido nalidíxico en 5 mL de agua desionizada estéril, agregar unas pocas gotas de NaOH 0,1 N para disolver (aproximadamente 0,2 mL). Filtrar para esterilizar y agregar al medio mEI. Agregar separadamente 0,02 g de triphenyl tetrazolium chloride (TTC) al medio mEI y mezclar.

11.6. El pH final del medio debe ser 7,1 ± 0,2. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período máximo de 90 días, ya sea en Erlenmeyer o frascos con tapón cerrado.

Preparación de las placas de Petri

11.7. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatizarlo a 45 °C. Colocar aproximadamente 3 mL de medio por cada placa de 47 mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.

11.8. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo.

11.9. Puede almacenarse a 2-8 °C por un período de 14 días.

Preparación de tubos para diluciones

11.10. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar.

11.11. Colocar 9 mL ± 0,2 mL de PBS en tubos de ensayo. Tapar con algodón o tapa de rosca. Colocar los tubos en una gradilla o cesto y cubrir con papel aluminio o papel de embalaje.

11.12. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

11.13. Conservar en heladera de material estéril (2-8 °C) hasta el momento de su uso, como máximo 30 días.

Análisis del de la muestra

11.14. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo con la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones seriadas en base 10, en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de PBS. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de la muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra, es conveniente filtrar tres volúmenes diferentes.

11.15. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadriculada hacia arriba sobre el portafiltros poroso del embudo, utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.

11.16. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de PBS estéril para humedecer el filtro.

11.17. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vórtex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado.

11.18. Luego enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de PBS estéril. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo en la placa de Petri sobre el medio, con la parte cuadriculada hacia arriba, evitando la formación de burbujas de aire, pasar suavemente la pinza por el borde del filtro para sacar el aire. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa y colocarla en la mesada para luego ser incubada.

11.19. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente PBS estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.

11.20. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de PBS estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de esta sobre la membrana al ser filtrada.

11.21. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.

11.22. Incubar las placas de Petri en posición invertida dentro de bolsas herméticas, en incubadora a 41 °C ± 0,5 °C durante 24 horas ± 2 horas.

Recuento

11.23. Las colonias de enterococos son aquellas que tienen un diámetro mayor o igual que 0,5 mm que presentan un halo azul, sin importar el color de las mismas. El halo no se considera en el tamaño del diámetro de la colonia.

11.24. El recuento de colonias se realiza en las placas que contengan entre 20 y 60 colonias de enterococos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. La ecuación que se emplea es la siguiente:

$$\text{Enterococos (ufc/100 mL)} = \frac{\text{Colonias de enterococos contadas}}{\text{mL de muestras filtrados}} \times 100$$

donde:

ufc: corresponde a Unidades Formadoras de Colonias.

12.2. Si el número de colonias de enterococos fuera entre 20 y 60 pero la placa posee más de 200 colonias de cualquier tipo, se informa como mayor al recuento realizado y se aconseja la realización de otro muestreo en ese punto. Informar como recuento estimado.

12.3. Si el número de colonias típicas es mayor a 60, el recuento se realiza siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación:

- Dividir la placa en 4 cuadrantes, contar en uno, multiplicar por cuatro.
- Contar 10 cuadrados del filtro al azar, promediar, multiplicar por el número total de cuadrados del filtro.

En ambos casos informar como recuento estimado

12.4. Si el recuento es cero, hay dos casos a considerar:

- Cuando el volumen filtrado es de 100 mL, se informa < 1 ufc/100 mL.
- Cuando el volumen filtrado es menor 100 mL, considerar 1 ufc en el mayor volumen filtrado, calcular la densidad de enterococos, y expresar los resultados como < valor obtenido.

12.5. Si el número de colonias a contar es menor a 20 se considera el recuento de la placa más cercana al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 50, 25 y 10 mL, y el conteo es 15, 6 y < 1 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(15x100)}{50} = \text{estimado 30 enterococos/100 mL}$$

12.6. Si el número de colonias a contar es menor y mayor a 20, se considera el recuento de las placas más cercanas al rango aceptable. Por ejemplo, si se examinan 0,1 y 0,03mL, y el conteo es 78 y 21 respectivamente, el resultado es el siguiente:

$$\frac{(78+21) \times 100}{(0,1 + 0,03)} = 76.000 \text{ enterococos/100 mL}$$

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Calidad del proceso analítico:**

- Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis, filtrando al inicio y al final del procesamiento de muestras, 100 mL de PBS incubando la placa con el filtro bajo las mismas condiciones que las muestras. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.
- Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control y registro de temperatura de la incubadora con termómetro calibrado).
- Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.
- Verificación mensual del 5 % de las muestras realizadas, aislando de cada muestra ambiental 10 colonias típicas (y en lo posible también colonias no típicas) siguiendo el procedimiento normalizado de operación para la verificación de enterococos 5070 UY. Cuando corresponda, ajustar el conteo basado en el porcentaje de verificación y expresar el resultado como enterococos verificados. Si no es posible hacer las verificaciones en el momento, aislar las colonias en TSA y guardarlas en la heladera a 2-8 °C hasta que se puedan procesar.

13.2. **Control de la precisión:** Para el control de la precisión del método se debe establecer el criterio de precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC07).

Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo valor de precisión rápidamente; también es un criterio válido calcularlo de forma anual con la totalidad de muestras analizadas en el sector para cada matriz ambiental. Una vez que está establecido el valor de precisión, analizar el 10 % de las muestras que ingresan al sector cada día, por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido. Con estos datos construir el gráfico de control de precisión correspondiente.

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista a través de la duplicación de los conteos de una misma placa, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9230A Introduction, Method 9230C Membrane filter techniques pp. 1192 a 1193.

14.2. EPA. Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside Agar (mEI). Setiembre 2014.

5065UY

Técnica de incubación tardía para la determinación de coliformes totales y termotolerantes por membrana filtrante

Técnica de Filtración por Membrana modificada

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica consiste en una modificación de la técnica estándar de filtración por membrana y permite transportar la muestra luego de la filtración a un laboratorio distante para transferirla a otro medio, incubar y completar el análisis. Este método puede ser usado cuando resulta impráctico aplicar el método convencional, por ejemplo en casos donde el lugar de muestreo es lejano al laboratorio, cuando el tiempo entre el muestreo y el análisis excede el permitido o cuando no es posible mantener la temperatura deseada de la muestra durante el transporte.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento: "Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales. "(5053UY).

2.7. Procedimiento: "Determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales." (5054UY).

2.8. Rutas de análisis (RMB 01 y RMB 02).

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El principio de esta técnica consiste en la filtración de un volumen conocido de la muestra a través de una membrana de nitrato de celulosa. El filtro se dispone en el medio de transporte bacteriostático y se transporta hasta el laboratorio. Se completa la determinación en el laboratorio transfiriendo la membrana, al medio de cultivo correspondiente según la determinación que se quiera realizar (coliformes termotolerantes o coliformes totales) y se incuba según las condiciones especificadas en cada procedimiento. Posteriormente, se realiza el recuento de colonias típicas desarrolladas en la placa.

3.2. El medio de transporte está compuesto por agentes bacteriostáticos y permite mantener a las bacterias viables evitando el crecimiento de otros organismos durante el período de transporte (máximo 72 h).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Realizar la preparación del medio de cultivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.

4.2. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Referirse al Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Referirse al Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Referirse al Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

8. REACTIVOS

8.1. Peptona (Difco u Oxoid)

8.2. Etanol 95 % (CH_3CH_2OH Nro. CAS 64-17-5)

8.3. Medio de cultivo específico: M-FC Agar o M-Endo Agar, según corresponda.

8.4. Agar (Difco u Oxoid)

8.5. Agua desionizada (según ES 01)

8.6. Fosfato de sodio monobásico ($NaH_2PO_4.H_2O$ Nro. CAS 10049-21-5)

8.7. Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4 Nro. CAS 7758-11-4)

8.8. Sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$ Nro. CAS 63-74-1)

8.9. Tris (hidroximetil) aminometano ($C_4H_{11}NO_3$ Nro. CAS 77-86-1)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Referirse al Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del agua peptonada al 0,1 %

11.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

Preparación del Medio de transporte (M-ST)

11.2. La composición del medio M-ST agar es la siguiente:

Fosfato de sodio monobásico, $NaH_2PO_4.H_2O$	0,1 g
Fosfato monoácido de potasio, K_2HPO_4	3,0 g
Sulfanilamida	1,5 g
Etanol (95 %)	10 mL
Tris (hidroximetil) aminometano	3,0 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1.000 mL

11.3. Disolver los ingredientes en la cantidad especificada de agua desionizada.

11.4. Posteriormente esterilizarlo a 121 °C durante 15 minutos. El pH final debe ser 8,6 ± 0,2.

11.5. Dispensar 4-5 mL del medio en placas de Petri.

11.6. Almacenar en la heladera y usar dentro de las 96 horas luego de preparado.

Preparación de las placas de Petri

11.7. Previo a la distribución del medio de cultivo en las placas de Petri estériles, termostatizarlo a 45°C. Colocar aproximadamente 3mL de medio por cada placa de 47mm de diámetro, bajo condiciones de esterilidad.

11.8. Dejar solidificar sobre la mesada de trabajo

11.9. Almacenar en heladera de material estéril entre 2-8 °C hasta su utilización, como máximo 96horas.

Preparación de tubos para diluciones

11.10. Estos tubos se preparan en caso de que sea necesario hacer diluciones de la muestra antes de filtrar. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY)

Análisis de la muestra

11.11. El volumen de muestra a ser filtrado se determina de acuerdo a la densidad bacteriana esperada y el origen de la muestra. En caso de ser necesario se preparan diluciones en cascada en los tubos de dilución, adicionando 1 mL de muestra o de la dilución previa, a los 9 mL de agua peptonada estéril. Se recomienda filtrar 2 volúmenes diferentes de muestra en múltiplo de 10. Si no se dispone de valores históricos de la muestra se recomienda filtrar tres volúmenes.

11.12. Conectar el equipo de filtración con embudo estéril. Colocar un filtro de nitrocelulosa estéril con la superficie cuadriculada hacia arriba sobre el portafiltros poroso del embudo utilizando pinzas humedecidas en alcohol, flambeadas y a temperatura ambiente.

11.13. Filtrar un volumen aproximado a 10 mL de agua peptonada estéril para humedecer el filtro.

11.14. Homogeneizar la muestra agitándola o usando el vórtex (si se hicieron diluciones en tubos), y filtrar el volumen seleccionado. Si el volumen a filtrar es poco (1 mL) colocar en el embudo aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril y luego la muestra, para lograr una mejor distribución de la misma sobre la membrana al ser filtrada.

11.15. Luego de filtrar la muestra enjuagar el embudo filtrando aproximadamente 10 mL de agua peptonada estéril.

11.16. Retirar el filtro con pinzas estériles y colocarlo con el entramado hacia arriba en el medio de transporte (M-ST agar). En estas condiciones la muestra se puede mantener a temperatura ambiente por un máximo de 72 horas.

11.17. Luego de filtrar cada muestra descontaminar los embudos humedeciéndolos con alcohol y flambeándolos. Una vez que el alcohol se consume hacer pasar suficiente agua peptonada estéril para lavar el sistema y enfriarlo más rápidamente.

11.18. Siempre comenzar la serie de filtración por la dilución mayor para no contaminar el embudo.

11.19. Una vez en el laboratorio, antes de las 72 hs del muestreo retirar el filtro del medio de transporte (m-ST Agar) y colocarlo en el medio de incubación especifico a la determinación que se quiera realizar, m-FC Agar para coliformes termotolerantes y m-Endo Agar para coliformes totales, evitando la formación de burbujas de aire, pasando suavemente la pinza por el borde del filtro. No tocar con la pinza el área de filtración del filtro ya que se arrastran células bacterianas. Asegurarse de que todo el filtro quede en contacto con el medio de cultivo. Cerrar la placa e incubarla invertida según corresponda según procedimiento.

Recuento

11.20. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Referirse al manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales correspondiente (5053UY, 5054UY).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9222C “Delayed Incubation Total Coliform Procedure” y Method 9222E “Delayed Incubation Thermotolerant Coliform Procedure”, pp. 1152 a 1153 y 1156.

5070UY

Control de calidad analítico para verificar enterococos determinados por la técnica de filtración de membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Dpto. Análisis Fisicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar los enterococos, determinados por la técnica de filtración por membrana, para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento: "Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales" (5058UY).

2.7. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.8. Instructivos de uso balanza (INE 16 C).

2.9. Instructivos de uso cámara de flujo laminar (INE 17).

2.10. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.11. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).

2.12. Instructivos de uso agitador vórtex (INE 44).

2.13. Ruta de análisis (RMB 09).

2.14. Registro de preparación de reactivos (RPR 16).

2.15. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINAMA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se definen como enterococos típicos a todas las colonias ≥ 0,5 mm de diámetro, con halo azul luego de ser incubadas en agar mEI.

3.2. En este procedimiento, se definen como enterococos verificados a los cocos gram positivos, catalasa positiva, que crecen e hidrolizan esculina en Agar Bilis Esculina (BEA) y que crecen en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) suplementada con 6,5% de NaCl a 35 °C ± 0,5 °C, en medio BHIA a 10 °C ± 0,5 °C y en medio BHIB a 45 °C ± 0,5 °C.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados de preferencia en cámara de flujo laminar, utilizando guantes descartables y túnica a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.2. Utilizar la técnica aséptica. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Incubadora a 35 °C ± 0,5 °C.
7.2. Incubadora a 45 °C ± 0,5 °C.
7.3. Incubadora a 10 °C ± 0,5 °C.
7.4. Equipo de recuento: microscopio binocular con un aumento de 10x a 15x y una fuente de luz fluorescente posicionada formando un ángulo de 60-80° con la placa.
7.5. Mecheros.
7.6. Porta y cubre objetos.
7.7. Asas bacteriológicas.
7.8. Termómetros calibrados para controlar las incubadoras.
7.9. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.
7.10. Balanzas de resolución 0,01 g.
7.11. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, estériles.
7.12. Autoclave.
7.13. Tubos de ensayo de vidrio estériles con tapa de algodón o de rosca.
7.14. Gradilla para tubos de ensayo.
7.15. Heladera a 2-8 °C.
7.16. Cámara de flujo laminar (de preferencia).
7.17. Bomba dosificadora (de preferencia).
7.18. Plancha calefactora o baño maría.
7.19. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL), con sus respectivos punteros estériles.
7.20. Desionizador de agua.
7.21. pHímetro (analizador de iones).
7.22. Papel de embalaje.

8. REACTIVOS

8.1. Medio de cultivo Brain Heart Infusion Agar (BHIA).
8.2. Medio de cultivo Brain Heart Infusion Broth (BHIB).
8.3. Medio de cultivo Bilis Esculina Agar (BEA).
8.4. Alcohol etílico.
8.5. Agua desionizada (ES 01).
8.6. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3 %.
8.7. Tinción de Gram: cristal violeta, lugol, acetona, safranina (o fucsina).
8.8. Cepa de Enterococus como control positivo de los medios BEA, BHIA, BHIB con 6,5% NaCl y BHIB incubado a 45 °C.
8.9. Cepa de *Escherichia coli* como control negativo del medio BEA, BHIA, BHIB con 6,5% NaCl.
8.10. Cepa de *Enterobacter aerogenes* como control negativo del medio BHIB incubado a 45 °C.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua destilada o desionizada y ser estéril.
9.2. Es imprescindible al iniciar el análisis limpiar la mesada de trabajo con alcohol y realizar el análisis entre dos mecheros para mantener las condiciones de esterilidad, también es posible utilizar cámara de flujo laminar.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del medio BHIA (agar BHI)

11.1. Preparar el medio BHIA como lo indica el envase.
11.2. Calentar para disolver y una vez disuelto autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
11.3. Una vez estéril, termostatizarlo a 45 °C aproximadamente y repartirlo en placas de Petri grandes. Rotular.
11.4. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Preparación del medio BHIB (caldo BHI)

11.5. Preparar el medio BHIB como lo indica el envase.
11.6. Calentar para disolver, y repartir aproximadamente 3-4 mL en tubos de ensayo de vidrio. Rotular los mismos.
11.7. Tapar los tubos con tapa de algodón, colocar en gradilla autoclavable, tapar con papel aluminio y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
11.8. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Preparación del medio BHIB con 6,5 % de NaCl

11.9. Agregar 6,5 g NaCl por 100 mL de solución, a la formulación de BHIB preparada en el punto anterior.

Preparación del medio Bilis Esculina Agar (BEA)

11.10. Preparar el medio BEA como lo indica el envase.
11.11. Calentar para disolver, y una vez disuelto autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
11.12. Una vez estéril, termostatizarlo a 45 °C aproximadamente y repartirlo en placas de Petri grandes. Rotular.
11.13. Conservar en heladera por un máximo de 14 días.

Procedimiento de verificación

11.14. Repicar colonias típicas y no típicas crecidas en el filtro de nitrocelulosa, a placas de Petri con BHIA para obtener colonias aisladas, e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 24 a 48 horas.
11.15. Transferir una asada de una colonia aislada en BHIA a tubos con BHIB e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.
11.16. De la misma colonia preparar un frotis para coloración de Gram y en otro porta objetos esparcir parte de la colonia que se está analizando para realizar la prueba de catalasa. En esta prueba se coloca una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % sobre el preparado. Si se observa el desarrollo de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno, se lee como catalasa positivo, e indica que la colonia no pertenece al género enterococos. Si la prueba es catalasa negativa, realizar la tinción de Gram. Los enterococos son células gram positivas, ovoides, de 0,5 a 1 µm de diámetro, mayoritariamente en pares o cadenas cortas.
11.17. Posteriormente transferir una ansada del tubo con BHIB a cada uno de los siguientes medios:
- una placa con BEA e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- un tubo con BHIB e incubar a 45 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- un tubo con BHIB con 6,5 % NaCl e incubar a 35 °C ± 0,5 °C por 48 horas.
- una placa con agar BHI e incubar a 10 °C ± 0,5 °C por 48 horas.

11.18. Se consideran como colonias verificadas de pertenecer al género enterococos aquellas que son gram positivas, catalasa negativa, y con crecimiento en BEA y en BHIB con 6,5 % NaCl a 35 °C, así como crecimiento en agar BHI a 10 °C, y en caldo BHI a 45 °C.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Cada vez que se analizan muestras se deben realizar los siguientes controles de los medios de cultivo BHIB, BHIA y BEA

13.1. **Verificación de esterilidad de los medios de cultivos:** incubar una porción representativa de cada lote de medio de cultivo preparado (1 de cada 50 aprox.) en iguales condiciones que la muestra, y verificar que no haya crecimiento

13.2. **Controles negativos:** inocular los medios BIHB con 6,5 % NaCl, BHIA, BEA y el medio BIHB a 45 °C con controles negativos e incubar en iguales condiciones que la muestra. No debe haber crecimiento.

13.3. **Controles positivos:** inocular los medios BHIB, BIHB con 6,5 % NaCl, BHIA y BEA con controles positivos e incubar en iguales condiciones que la muestra. Debe evidenciarse crecimiento típico.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9020B Intralaboratory Quality Control Guidelines, Method 9230C Membrane filter techniques pp. 1196 a 1198.

14.2. EPA. Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside Agar (mEI). Setiembre 2014

5071UY

Control de calidad analítico para verificar coliformes totales determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas rápidas

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Dpto. Análisis Fisicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar coliformes totales, determinados por la técnica de filtración por membrana, para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento ˝Determinación de coliformes totales en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales˝ (5054UY).

2.7. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.8. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.9. Instructivo de equipo analizador de iones (INE 98).

2.10. Instructivo de uso balanza (INE 16C).

2.11. Instructivo de uso cámara de flujo laminar (INE 17).

2.12. Ruta de análisis (RMB 07).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Para la verificación de las colonias de coliformes totales se emplean pruebas bioquímicas convencionales o test bioquímicos rápidos como lo son el ONPG (ortonitrofenil galactósido) y CO (citocromo oxidasa).

3.2. Prueba enzimática β-galactosidasa: Los microorganismos fermentadores de lactosa poseen la enzima inducible β-galactosidasa que hidroliza a la lactosa para formar galactosa y dextrosa. Esta enzima también hidroliza al sustrato ortonitrofenil-β-D-galactosidasa (ONPG), el cual no depende de la lactosa permeasa para entrar en la célula. La hidrólisis del ONPG produce un producto final amarillo, el ortonitrofenol. La prueba puede realizarse directamente sobre una suspensión bacteriana densa en solución salina o sobre un cultivo incubado en un caldo de peptonas, como por ejemplo, el Caldo de soja tríptica al 1%. Después de añadir un disco ONPG a la suspensión o al cultivo, el tubo se incuba a 35 °C durante 4 a 6 h y se observa la presencia o ausencia de coloración amarilla.

3.3. Prueba enzimática de citocromo oxidasa, esta enzima es necesaria para la oxidación del citocromo-C. Este citocromo sufre reducción, ocurriendo la oxidación del colorante que vira a color púrpura. Los coliformes no poseen la enzima citocromo-C oxidasa dando resultado negativo.

3.4. Las colonias de coliformes totales verificadas son aquellas colonias de coliformes totales que presenta el siguiente perfil enzimático: citocromo-oxidasa negativa y β-galactosidasa positivas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados en condiciones asépticas, en cámara de flujo laminar, o entre mecheros, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.2. Después del uso, los materiales contaminados debe esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Incubadora a 35 °C ± 0,5 °C
7.2. Mecheros.
7.3. Asas bacteriológicas.
7.4. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.
7.5. Balanzas de resolución 0,01.
7.6. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, estériles.
7.7. Autoclave.
7.8. Tubos de vidrio pequeños (tipo viales) con tapa de algodón estériles.
7.9. Gradilla para tubos de vidrio pequeños, o viales.
7.10. Heladera a 2-8 °C.
7.11. Cámara de flujo laminar.
7.12. Plancha calefactora o baño maría.
7.13. Pipeta automática de 100-1.000 µL con sus respectivos punteros estériles.
7.14. Pinzas.
7.15. Desionizador de agua.
7.16. pHímetro (analizador de iones).
7.17. Papel de embalaje.

8. REACTIVOS

8.1. Discos para el test bioquímico de citocromo oxidasa (CO) almacenados en heladera hasta su fecha de vencimiento.
8.2. Discos para el test bioquímico de β- galactosidasa (ONPG), almacenados en heladera hasta su fecha de vencimiento.
8.3. Tripticasa soja agar (TSA)
8.4. Caldo de soja tríptica (TSB)
8.5. Agua desionizada (según ES 01)
8.6. Alcohol etílico.
8.7. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua desionizada y ser estéril.
9.2. Las colonias de coliformes totales deben ser aisladas en TSA u otro agar nutritivo antes de realizar la verificación. Las colonias a verificar deben pertenecer a un cultivo joven (18 – 48 horas).
9.3. No pueden ser utilizadas asas de metal para la prueba de CO dado que el metal reacciona con el reactivo de dicha prueba enzimática dando resultados falsos positivos, por lo que se recomienda usar asas de plástico descartables estériles (o en su defecto emplear punteros de pipetas o palillos de madera esterilizados previamente en autoclave por 15 minutos a 121°C).
9.4. Al picar la colonia para colocar una asada en el disco de CO, tener cuidado de no arrastrar medio de cultivo junto con la colonia ya que dificulta la lectura del test.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Obtención de colonias aisladas y puras en TSA

11.1. Preparar el medio TSA según instrucciones del fabricante como se indica en el envase.
11.2. Mezclar y calentar para disolver
11.3. Luego de disuelto, autoclavar 15 minutos a 121°C.
11.4. Una vez estéril, termostatizarlo a 45 °C aproximadamente, y repartirlo en las placas de Petri. Dejar registro. Rotular indicando fecha de elaboración.
11.5. Almacenar las placas en posición invertida en heladera por un máximo de 2 semanas.
11.6. Al momento de utilizarlas, dejarlas secar en estufa a 35 °C ± 0,5 °C para termostatizar.
11.7. En cámara de flujo realizar aislamientos por estrías de colonias típicas y no típicas de coliformes totales.
11.8. Incubar las placas invertidas en estufa a 35 °C ± 0,5 °C por 24 horas.
11.9. Las placas con las colonias aisladas y puras pueden ser selladas con Parafilm y guardadas en heladera a 2-8 °C hasta por 24 horas antes de realizar las pruebas bioquímicas.

Procedimiento de verificación

Test de CO:

11.10. Si se cuenta con los discos comerciales se pude proceder de diferentes maneras:

- Colocar de forma aséptica en una placa de petri estéril, un disco de CO. Humedecer con agua desionizada estéril. Con un asa descartable o puntero de pipeta estéril, tomar una asada de la colonia a verificar, y tocar con el inóculo el disco. Esperar 5 min y leer la reacción por viraje del indicador a color púrpura indicando reacción positiva.
- Otra manera es suspender la colonia en un tubo con 0,5 mL de agua desionizada estéril y luego colocar el disco. Esperar 5 min para leer la reacción. Será un resultado positivo aquella colonia que desarrolle un color rojo intenso sobre el disco.

Test ONPG:

11.11. Preparar viales de vidrio conteniendo 0,5 mL de Caldo de soja tripticasa (TSB) al 1% (alternativamente, preparar viales que contengan 0,2 mL de solución salina normal: cloruro de sodio al 0,9 %). Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. Dejar enfriar.
11.12. Suspender una asada de la colonia previamente aislada en TSA en el vial con TSB al 1% (es necesario inocular en forma cargada). Colocar el disco comercial de ONPG asépticamente en el vial, e incubar 4-6 horas a 35 °C ± 0,5 °C. Son positivas aquellas colonias que desarrollan color amarillo. Continuar incubando los tubos que presenten una reacción negativa por un total de 24 horas antes de desecharlos como negativo.
11.13. Las colonias de coliformes totales verificadas son aquellas colonias que presenta el siguiente perfil enzimático: citocromo-oxidasa (CO) negativa y β-galactosidasa (ONPG) positivas.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.
12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Cada vez que se analizan muestras se deben realizar los siguientes controles:

13.1. **Controles negativos:** inocular el disco CO y el disco ONPG con una especie negativa para coliformes totales, e incubar en iguales condiciones que la muestra. Debe dar resultados CO positivo (viraje a color púrpura) y ONPG negativo (sin cambio de color).
13.2. **Controles positivos:** inocular el disco CO y el disco ONPG con una especie conocida de coliforme total, e incubar en iguales condiciones que la muestra. Debe dar resultado CO negativo (no hay viraje de color) y ONPG positivo (coloración amarilla).

13.3. **Verificación de esterilidad**. Incubar 1 vial conteniendo el disco comercial de ONPG y TSB, en iguales condiciones que las muestras; a su vez humedecer un disco de CO con agua destilada estéril. No debe evidenciarse viraje de color en ningún caso.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9020 B Intraboratory Quality Control Guidelines (10. Verification) pp. 1077, y Method 9225 Differentiation of Coliform bacteria. pp. 1189-1191

14.2. Prospecto de los discos comerciales ONPG y prueba Oxidasa.

5072UY

Control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes determinados por la técnica de filtración por membrana para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista

Pruebas bioquímicas

Elaborado - S. Castro Scarone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Dpto. Análisis Fisicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza en el control de calidad analítico para verificar coliformes termotolerantes (también llamados coliformes fecales), determinados por la técnica de filtración por membrana, para lograr un mayor reconocimiento de colonias típicas y no típicas por parte del analista. También se aplica para evaluar el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos, debiéndose realizar separadamente para cada tipo de matriz ambiental.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Procedimiento: "Determinación de coliformes termotolerantes en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales " (5053UY).

2.7. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE97, INE 155).

2.8. Instructivos de uso balanza (INE 16C).

2.9. Instructivos de uso cámara de flujo laminar (INE 17).

2.10. Instructivo de uso desionizador (INE 121).

2.11. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).

2.12. Ruta de análisis (RMB 08).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El grupo de bacterias de coliformes fecales se definen como aquellas bacterias gram-negativas, no formadoras de esporas que crecen y producen gas en caldo lauril triptosa (CLT) luego de ser incubadas a 35 °C ± 0,5 °C por 48 h ± 2 h y posteriormente fermentan lactosa y producen gas tras ser incubadas a 44,5 °C ± 0,2 °C por 24 h ± 2 h en caldo EC. La verificación de coliformes termotolerantes se basa en la capacidad de los mismos de fermentar la lactosa presente en el caldo lauril triptosa; a su vez la sal biliar presente en el medio de cultivo EC, inhibe el desarrollo de bacterias formadoras de endosporas y bacterias gram positivas.

3.2. En este grupo se incluyen los siguientes géneros: *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella*. Las colonias de coliformes termotolerantes verificada son aquellas colonias que evidencian crecimiento y formación de gas cuando se incuban en caldo lauril triptosa y caldo EC.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Realizar la preparación del medio de cultivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.

4.2. Los aislamientos y las verificaciones deben ser realizados en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.3. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. No aplica.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Incubadora a 35 °C ± 0,5 °C.
7.2. Baño de agua o Incubadora a 44,5 °C ± 0,2 °C.
7.3. Mecheros.
7.4. Campanas de Durham de borosilicato de 7 mm x 45 mm aproximadamente.
7.5. Asas bacteriológicas.
7.6. Termómetros calibrados para controlar incubadoras.
7.7. Material de vidrio estéril para preparación de los medios de cultivo.
7.8. Balanzas de resolución 0,01 g.
7.9. Placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, estériles.
7.10. Autoclave.
7.11. Tubos de ensayo de vidrio estériles con tapa de algodón o de rosca.
7.12. Gradilla para tubo de ensayos.
7.13. Heladera a 2-8 °C.
7.14. Cámara de flujo laminar.
7.15. Plancha calefactora, microondas o baño maría.
7.16. Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10mL), con sus respectivos punteros estériles.
7.17. Desionizador de agua.
7.18. pHímetro (analizador de iones).
7.19. papel de embalaje.

8. REACTIVOS

8.1. Tripticasa soja agar (TSA).
8.2. Medio de cultivo caldo de lauril triptosa (CLT).
8.3. Medio de cultivo caldo EC Broth (EC).
8.4. Etanol (CH_3CH_2OH Nro. CAS 64-17-5).
8.5. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
8.6. Hidróxido de Sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1,0 N para ajuste de pH.
8.7. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) 1,0 N para ajuste de pH.
8.8. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. El material de vidrio que se emplee en los aislamientos y los procedimientos de verificaciones debe estar lavado, enjuagado con agua desionizada y ser estéril.
9.2. Las colonias de coliformes termotolerantes deben ser aisladas en TSA u otro agar nutritivo antes de realizar la verificación con el objetivo de obtener mayor inóculo para realizar las verificaciones; la verificación debe ser realizada a partir de una colonia aislada, con buen crecimiento y que tenga entre 18-48horas de crecimiento.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas.

Obtención de colonias aisladas y puras en TSA

11.1. Preparar el medio TSA según instrucciones del fabricante como se indica en el envase.
11.2. Mezclar y calentar para disolver
11.3. Luego de disuelto, autoclavar 15 minutos a 121 °C.
11.4. Una vez estéril, termostatizarlo a 45 °C aproximadamente, y repartirlo en las placas de Petri. Dejar registro de su preparación. Rotular indicando fecha de elaboración.
11.5. Almacenar las placas en posición invertida en heladera por un máximo de 2 semanas.
11.6. Al momento de utilizarlas, dejarlas secar en estufa a 35°C ± 0,5°C para termostatizar.
11.7. En cámara de flujo realizar aislamientos por estrías de colonias típicas y no típicas de coliformes termotolerantes.
11.8. Incubar las placas invertidas en estufa a 35 °C ± 0,5°C por 24 horas.
11.9. Las placas con las colonias aisladas y puras pueden ser selladas con Parafilm y guardadas en heladera a 2-8 °C hasta por 24 horas antes de realizar las pruebas bioquímicas.

Preparación de los medios de cultivo

11.10. Caldo lauril triptosa (CLT): Por cada litro a preparar utilizar 35,6 g de CLT y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de 6,8 ± 0,2 ajustar con soluciones de NaOH o HCl 1N. Dispensar aproximadamente 5,0 mL en tubos de ensayos y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo y fecha de elaboración. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera. Confirmar este proceso según instrucciones del fabricante.
11.11. Caldo EC: Por cada litro a preparar, colocar 37,0 g de EC y 1,0 L de agua desionizada. Mezclar y calentar para disolver. Medir el pH, si excede el rango de 6,9 ± 0,2, ajustar con soluciones de NaOH o HCl 1N. Dispensar aproximadamente 5,0 mL en tubos de ensayo y agregar una campana de Durham invertida en cada tubo. Rotular indicando medio de cultivo y fecha de elaboración. Tapar con algodón, cubrir los tubos con papel de embalaje y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Almacenar por un máximo de 2 semanas en heladera. Confirmar este proceso según instrucciones del fabricante.

Análisis de la muestra.

11.12. Una vez obtenidas las colonias aisladas en TSA, con un asa de inoculación debidamente flambeada y enfriada, transferir cada colonia aislada a ser verificada, a un tubo de ensayo con el medio CLT (si el medio está almacenado en heladera, retirar 1 - 1,5 horas antes de realizar la inoculación para que alcance temperatura ambiente).
11.13. Sembrar los tubos. Luego de la transferencia, incubar todos los tubos inoculados a 35 °C ± 0,5 °C durante 24 ± 2 h. Aquellos tubos que no evidencian crecimiento o producción de gas en 24 horas (dudosos), se recomienda que sean incubados durante 24 h más para asegurar la lectura correcta de los mismos.
11.14. Los tubos en los cuales se evidenció crecimiento y producción de gas dentro de las 48 horas, se consideran presuntivamente positivos. La presencia de gas pero no de crecimiento se considera negativa, ya que puede deberse a un mal manejo de la campana.
11.15. Para los tubos con reacción presuntiva positiva pasar a la fase de confirmación con EC. Para ello, por cada tubo positivo de CLT, se inocula un tubo de EC (si el medio está almacenado en heladera, retirar 1 - 1,5 horas antes de realizar la inoculación para que alcance temperatura ambiente).
11.16. Agitar suavemente el tubo que presentó reacción positiva presuntiva.
11.17. Usar un asa estéril para transferir crecimiento desde el tubo de reacción presuntiva positiva al correspondiente tubo de EC.
11.18. Colocar todos los tubos inoculados de EC en un baño de agua o incubadora a 44,5 ± 0,2 °C y dejarlos por 24 ± 2 horas.
11.19. Luego de la incubación, examinar cada tubo en busca de crecimiento y producción de gas. El crecimiento y la producción de gas en caldo EC luego de 24 ± 2 horas son considerados como reacción de coliformes fecales positiva. La presencia de gas pero no de crecimiento se considera negativa.
11.20. Registrar los resultados positivos y negativos. Son colonias de coliformes termotolerantes aquellas que evidencian crecimiento y producción de gas en ambos medios de cultivo (CLT y EC).

Nota 1: Partiendo de las mismas colonias crecidas en TSA, se puede incubar simultáneamente los tubos en CLT y EC, de manera de reducir los tiempos de verificación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Sobre el total de colonias no típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos negativos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

12.2. Sobre el total de colonias típicas aisladas, se calcula el porcentaje de falsos positivos de acuerdo a los perfiles bioquímicos de los aislamientos realizados.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Cada vez que se analizan muestras se deben realizar los siguientes controles de los medios de cultivo CLT y EC:

13.1. **Verificación de esterilidad de los medios de cultivos:** incubar una porción representativa de cada lote de medio de cultivo preparado (1 de cada 50 aprox.) en iguales condiciones que la muestra, a 35 °C ± 0,5 °C (CLT) y 44,5 °C ± 0,2 °C (EC) durante 48 horas y 24 horas respectivamente, y verificar que no haya crecimiento

13.2. **Controles negativos:** inocular el medio CLT y el medio EC con una especie negativa conocida de coliformes termotolerantes. Incubar en iguales condiciones que la muestra. No debe haber crecimiento ni producción de gas.

13.3. **Controles positivos:** inocular los medios CLT y EC con una especie conocida de coliformes termotolerantes e incubar en iguales condiciones que la muestra. Debe evidenciarse crecimiento y producción de gas.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9020 B Intraboratory Quality Control Guidelines (10. Verification) pp. 1077.

5079UY

Determinación de enterococos en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales

Sustrato definido, Enterolert®

Elaborado - G. Pistone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de enterococos por la tecnología de sustrato definido en aguas naturales superficiales o subterráneas, aguas recreacionales y aguas residuales domésticas e industriales, obteniendo resultados en 24 horas.

1.2. Algunas especies de enterococos que detecta la prueba de Enterolert son: *E. faecalis, E. faecium, E. gallinarum, E. avium, E. casseliflavis y E. durans.*

1.3. El límite de detección, al igual que el límite de cuantificación, es de 1 NMP/100 mL.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de Control de Calidad para Análisis Microbiológicos (PGC07).

2.6. Instructivo de uso de autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.7. Instructivo de uso de balanza (INE 16C).

2.8. Instructivo de uso de cámara de flujo laminar (INE17).

2.9. Instructivo de uso de desionizador (INE 121).

2.10. Instructivo de uso de sellador Quanti-tray (INE 43).

2.11. Instructivo de uso incubadora (INE 46).

2.12. Ruta de análisis (RMB 10).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El método consiste en agregar a 100 mL de la muestra de agua un reactivo específico, e incubar la muestra durante 24 horas. Enterolert detecta enterococos tales como *E. faecium y E. faecalis* en agua dulce y agua de mar. La identificación se basa en que cuando los enterococos utilizan su enzima β-D-glucosidasa para metabolizar el indicador de nutrientes de Enterolert, 4-metil-umbeliferil β-D-glucosida (4-MUG), la muestra fluoresce.

3.2. Enterolert detecta enterococos en una muestra de agua de 1 ufc/100 mL dentro de 24horas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Manipular el reactivo utilizando guantes descartables, túnica y máscara para material particulado.

4.2. El análisis debe ser realizado en forma aséptica, entre mecheros o en cámara de flujo laminar, utilizando túnica, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades. Se recomienda el uso de lentes de seguridad.

4.3. Después del uso, los materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser descartados.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La muestra de agua de mar deberá diluirse al menos 10 veces con agua destilada o deisonizada estéril, para evitar interferencia microbiana por algunos *Bacillus spp.*

5.2. Si la muestra de agua tiene un cierto color de fondo, comparar la muestra inoculada de Enterolert con un blanco testigo de la misma muestra de agua.

5.3. Enterolert es una prueba primaria del agua. Las características de desempeño de rendimiento de Enterolert no se aplican a muestras alteradas por cualquier enriquecimiento o concentración previos.

5.4. Algunas especies del género *Serratia, Klebsiella, y Aerococcus* (no enterococos) que producen la enzima β-D glucosidasa, no producen respuesta positiva a menos que se encuentren a una concentración mayor a 105 ufc/100 mL.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno autoclavable, de boca ancha, estériles. El frasco debe llenarse, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar que se pueda contaminar durante el muestreo.

6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 8°C (> 0°C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 horas. Para efluentes industriales es de 8 horas.

6.4. Para efluentes industriales líquidos que fueron clorados, el frasco debe contener tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$ Nro. CAS 10102-17-7) en una concentración de 100 mg/L de muestra para neutralizar el cloro residual. Su acción bactericida durante el transporte, permite que el contenido microbiano al procesar la muestra, sea lo más semejante posible al momento del muestreo. En un frasco de muestreo de 120 mL, 0,1 mL de solución de $Na_2S_2O_3$ al 10 % (10 g en 100 mL), es suficiente para neutralizar 15 mg/L de cloro residual.

Alternativamente, en un frasco de muestreo de 500 mL (conteniendo aprox. 400 mL de muestra), agregar 0,4 mL de la solución al 10 % de tiosulfato de sodio antes de la esterilización del mismo.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Bandeja de incubación estériles (Quanti-Tray IDEXX).
7.2. Sellador de bandejas (Quanti-Tray Sealer Model 2X IDEXX).
7.3. Probetas de 100 mL estériles.
7.4. Estufa de incubación a 41 °C ± 0,5 °C.
7.5. Lámpara UV 365 nm.
7.6. Recipientes estériles de vidrio o plástico con capacidad mínima de al menos 150 mL.
7.7. Ansas.
7.8. Autoclave.
7.9. Mecheros.
7.10. Pipetas automáticas de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles
7.11. Termómetros calibrados para controlar la temperatura de la incubadora.
7.12. Heladera a 2-8 °C.
7.13. Cámara de flujo laminar (de preferencia).
7.14. Cinta de revelado de autoclave.
7.15. Desionizador de agua.
7.16. Balanza de resolución 0,01 g.
7.17. Papel de embalaje.

8. REACTIVOS

8.1. Reactivo Enterolert™ IDEXX (almacenar entre 2-30ºC en oscuridad)
8.2. Agua desionizada (grado 2, según norma ISO 3696 en su versión vigente).
8.3. Alcohol etílico.
8.4. Cultivos puros de colección (ATCC) – Referirse al Manual de Control de Calidad Analítico.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Al iniciar el análisis limpiar la mesada con alcohol y trabajar entre dos mecheros encendidos o en cámara de flujo laminar para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

9.2. El material de vidrio y plástico que se emplee debe estar estéril.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas:

Preparación del agua desionizada estéril

11.1. Adicionar 1000 mL de agua desionizada en una botella.

11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclavado y esterilizar en autoclave por 15 minutos. Rotular indicando fecha de esterilización.

11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 30 días. Rotular indicando fecha de esterilización.

Análisis de la muestra

11.4. Termostatizar la muestra a temperatura ambiente y homogeneizar.

11.5. Añadir el contenido del reactivo Enterolert a una muestra de 100 mL de agua (o la dilución correspondiente) a temperatura ambiente, y en un recipiente estéril. En el caso de realizar diluciones, siempre llevar a 100 mL con agua desionizada estéril.

11.6. Tapar y agitar el recipiente hasta disolver.

11.7. Verter la mezcla de muestra + reactivo en una bandeja de incubación y sellar en el sellador de Quanti-Tray de IDEXX.

11.8. Colocar la bandeja sellada en la incubadora a 41 °C ± 0,5 °C durante 24 horas. Los resultados son definitivos entra las 24-28 horas

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Para determinar el número más probable (NMP) de enterococos /100 mL buscar fluorescencia usando una luz ultravioleta de 6 vatios, y 365 nm a una distancia de unos 13cm de la muestra en un ambiente oscuro. Apuntar el haz de luz en dirección contraria a los ojos y hacia la muestra. Contar el número de pocillos fluorescentes grandes y chicos y obtener el valor de la tabla de doble entrada brindada por el proveedor (ver Anexo). Este valor corresponde al NMP de enterococos /100 mL. En caso de haber diluido la muestra realizar la corrección correspondiente. Cualquier grado de flurescencia de color azul se considera positivo para la presencia de enterococos.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Calidad del proceso analítico:

- Control de medios de cultivo a través del empleo de cultivos puros de colección positivos y negativos, cada vez que se analizan muestras.

No fluorescente	Agua estéril
No fluorescente	Control negativo
Fluorescencia azul	Control positivo

- Control de esterilidad de los materiales empleados en el análisis: Incubar 100mL de agua desionizada estéril para comprobar esterilidad. Si los controles indican contaminación, volver a analizar las muestras afectadas.
- Control de las condiciones de incubación cada vez que se analizan muestras (control y registro de temperatura de la incubadora con termómetro calibrado).

13.2. **Control de la precisión:** Establecer el Criterio de precisión tal como se detalla en el Manual de Control de Calidad Analítico (PGC07). Al comienzo de nuevos programas de monitoreo hacer la mayor cantidad posible de muestras por duplicado para obtener un nuevo valor de precisión rápidamente. Alternativamente se puede calcular de forma anual con la totalidad de muestras analizadas en el Sector para cada matriz ambiental. Una vez que está establecido el nuevo valor de precisión, analizar el 10 % de las muestras por duplicado (siendo el mínimo de duplicados a realizar igual a 1), y calcular el logaritmo de cada par de duplicados. La diferencia entre ambos no debe superar el valor de precisión previamente establecido. Con estos datos construir el gráfico de control de precisión correspondiente

13.3. **Reproducibilidad:** Chequeo mensual de recuento entre analistas, aceptando como máximo una variación del 10 %.

13.4. **Repetibilidad:** Chequeo mensual del recuento de un mismo analista, aceptando como máximo una variación del 5 %.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Method 9230 D. Fluorogenic Substrate Enterococcus Test pp. 1198-1199.

14.2. Kit de análisis Enterolert. IDEXX Laboratories. .https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/enterolert/

ANEXO: Tabla de doble entrada Enterolert®

IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table *(per 100ml)*

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.3	9.3	10.4	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.4	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2	41.4
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9	43.2
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6	44.9
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4	46.7
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.8	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3	48.6
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2	50.6
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2	52.5
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2	54.6
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4	56.8
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6	59.0
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9	61.3
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3	63.8
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7	66.3
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3	68.9
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0	71.6
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9	74.5
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9	77.6
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0	80.8
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4	84.2
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9	87.8
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6	91.5
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6	95.7
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.6	95.7	97.8	100.0
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4	104.7
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3	109.7
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7	115.2
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6	121.2
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0	127.8
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2	135.4
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3	143.7
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5	153.2
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2	164.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8	177.4
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2	193.6
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5	213.9
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3	241.4
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0	280.9
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2	344.3
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6	435.2	461.2

IDEXX Sales and Technical Support
1-800-321-0207 or 1-207-856-0496
idexx.com/water

09-63235-02

IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table *(per 100ml)*

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive																							
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.4	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	40.0	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.7	28.7	29.8	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	43.0	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.4	31.4	32.5	33.6	34.7	35.8	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.8	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.9	41.0	42.1	43.2	44.4	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.7	35.8	36.9	38.0	39.2	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.3	59.4	60.6	61.8
8	36.6	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	59.0	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.7	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.7	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.3	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.6	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	62.0	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.4
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.5	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.8	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.7	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.1	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.8	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.2	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.4	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.3	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.7	83.3	85.1	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.3	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.7	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.2	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.8	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.4	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.7	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.4	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.2	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.5	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.3	150.3	153.5	156.7	159.9	163.1	166.5	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.2	149.4	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.7	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.7	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.1	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.5	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.1	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.2	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.7
44	193.6	199.3	205.1	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.8	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.2	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.3	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.8	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.1	452.0	467.4	483.3	499.6	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.3	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.6	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.2
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.2	1119.9	1203.3	1299.7	1413.6	1553.1	1732.9	1986.3	2419.6	>2419.6

09-63235-02

IDEXX Sales and Technical Support
1-800-321-0207 or 1-207-856-0496
idexx.com/water

5080UY

Determinación de Enterococos en aguas naturales

Método molecular

Elaborado - Cecilia Ghiazza

Modificado - Irene Pandulli

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de enterococos en aguas naturales mediante la combinación de la filtración de la muestra con la cuantificación por qPCR. El límite de detección es 131 CCE y el límite de cuantificación es 394 CCE.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16).
2.6. Procedimiento de control de calidad para análisis microbiológicos (PGC 07).
2.7. Procedimiento manejo de cepas (PGC 24).
2.8. Instructivo de uso bomba de vacío (INE 02).
2.9. Instructivos de uso autoclave vertical (INE 155 e INE 97).
2.10. Instructivo de uso balanza (INE 16).
2.11. Instructivo de uso desionizador (INE 82).
2.12. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).
2.13. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44).
2.14. Instructivo de uso incubadora 35 °C (INE 46).
2.15. Instructivo de uso de centrifuga (INE 124).
2.16. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 145).
2.17. Instructivo de uso de termociclador a tiempo real (INE 149).
2.18. Rutas de análisis de determinación de Enterococo (RMB 18).
2.19. Ruta para preparación de reactivos de biología molecular (RPR25).
2.20. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se considera enterococos a todas las especies del género Enterococcus que cuentan con la secuencia de nucleótidos del gen lsrRNA depositada en una base de datos genética internacional como GenBank (al momento del desarrollo del método de referencia de acuerdo a 14.6).
3.2. El principio de esta técnica consiste en filtrar 100 mL de muestra de agua a través de una membrana de 0,45 micras. A partir de esta membrana que retiene las células bacterianas, se extrae el ADN con un kit de extracción de columna.
3.3. El ADN extraído se utiliza para la amplificación por qPCR y la detección de una secuencia del gen lsrRNA mediante un sistema de primers con sonda de hidrólisis.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. La manipulación de la muestra y el análisis deben ser realizados utilizando túnica, anteojos de protección y guantes descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Las partículas coloidales o en suspensión presentes en las muestras de agua pueden interferir con la recuperación del ADN durante su extracción.

5.2. A su vez, estas partículas pueden interferir con el análisis de qPCR. Las reacciones de amplificación del ADN también pueden verse inhibidas por talco, polvo, restos de material vegetal (carbohidratos complejos, almidón), restos de reactivos de la extracción de ADN (fenol, CTAB, guanidina de las columnas de purificación, etc.). Todo esto afecta la actividad enzimática de la polimerasa y/o inhibe la unión de la enzima, impacta sobre la hibridación de los primers y sonda con el ADN diana o en la extinción de la fluorescencia de la sonda hidrolizada. Es recomendable asegurar la pureza y calidad del ADN a emplear, así como la higiene de las superficies y las pipetas a emplear.

5.3. Si la cantidad de ADN de la muestra es excesiva, se puede ver inhibida la reacción de amplificación. Se puede cuantificar el ADN y realizar diluciones pertinentes si es necesario (trabajar con un máximo de 50-20 ng de ADN por reacción).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio o de polipropileno autoclavable, de boca ancha y estériles. El frasco debe llenarse con al menos tres cuartos del volumen, dejando una cámara de aire para poder homogeneizar la muestra antes de procesarla. Mantener el frasco tapado hasta el momento de su uso, no apoyar la tapa en ningún lugar para evitar que se pueda contaminar.

6.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.3. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja no transcurran más de 6 horas entre la toma de muestra y la primera etapa de filtración de la muestra. De no ser esto posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). Para aguas naturales el período máximo de conservación de la muestra es de 24 h.

6.4. Una vez filtrada la muestra, se puede realizar la extracción de ADN inmediatamente, o almacenar el filtro a -20 °C por una semana o hasta tres meses a -80 °C.

6.5. El ADN extraído se puede mantener refrigerado por períodos cortos. Si se desea almacenar a largo plazo, deberá guardarse en alícuotas en ultrafreezer.

6.6. A partir de la sección 11.11 se debe utilizar agua calidad biología molecular.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanzas de resolución 0,01 g.
7.2. Autoclave.
7.3. Mecheros.
7.4. Material de vidrio para preparación del medio de cultivo.
7.5. Incubadora a 35 µC
7.6. Heladera a 2-8 °C.
7.7. Freezer ≤ -20 °C
7.8. Anzas.
7.9. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 90 mm de diámetro.
7.10. Cinta de revelado de autoclave.
7.11. Destilador de agua.
7.12. Desionizador de agua.
7.13. Equipo dispensador de agua Ultra Pura.
7.14. pHímetro (analizador de iones.
7.15. Cabina de preparación de la PCR .
7.16. Minifuga .
7.17. Vortex .
7.18. Juego de micropipetas de 200- 1000 µL y de 10 mL para uso microbiológico .
7.19. Juego de micropipetas de 200- 1000 µL, 20-200 ?L, 2 – 20 µL para uso exclusivo de reactivos (NO ADN).
7.20. Pipeta 0,2-2 µL para uso exclusivo de ADN .
7.21. Tips estériles .
7.22. Tubos eppendorff de 1,5 mL estériles .
7.23. Tubos de PCR ópticamente adecuados, estériles .
7.24. Termociclador a tiempo real .
7.25. Centrífuga con rotor adecuado para eppendorf, que tenga la capacidad de alcanzar velocidades de 10000 xg.
7.26. Gradillas refrigerantes o acumuladoras de frío.
7.27. Espectrofotómetro de rango UV o Nanodrop o Fluorómetro para cuantificar ADN (Qubit, Invitrogen o similar con su correspondiente kit).
7.28. Cabina de trabajo con desinfección UV de ADN/ARN.
7.29. Equipo de filtración.
7.30. Bomba.
7.31. Filtros estériles, de 47 mm de diámetro, con tamaño de poro de 0,45 µm.

8. REACTIVOS

8.1. Etanol 70%
8.2. Agua desionizada (según ES 01)
8.3. Agua ultrapura estéril, alicuotada en tubos de 1,5 mL (según ES 01 en adelante, calidad biología molecular).
8.4. Kit de extracción de ADN de columna (DNeasy PowerWater, Qiagen o similar).
8.5. Mix de reacción de PCR, que incluya buffer de reacción, dNTP, ADN polimerasa Hot Start, cloruro de magnesio (QuantiNova, Qiagen o similar).
8.6. Cepa de referencia de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
8.7. ADN de Enterococo para control positivo de la reacción de amplificación, extraído a partir de la cepa de referencia.
8.8. Buffer fosfato (PBS)

Composición

Componente	Cantidad
Fosfato monosódico (NaH_2PO_4)	0,58 g
Fosfato sódico (Na_2HPO_4)	2,50 g
Cloruro de sodio	8,50 g
Agua destilada	1,0 L

Autoclavar después de la preparación a 121°C (15 PSI) durante 15 minutos. El pH final debe ser de 7,4 ± 0,2.

8.9. Infusión cerebro corazón agar (BHIA). Preparar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. BHIA contiene los mismos componentes que BHIB con la adición de 15 g de agar por litro de caldo BHI.
8.10. Albúmina de suero bovino (BSA) (CAS no. 9048-46-8). Disolver en agua calidad PCR si es necesario para obtener concentración de 10 mg/mL.
8.11. Juego de primers y sonda para *Enterococcus*, pureza ≥ 90%:

Secuencia target	Primer/sonda	Secuencia	Tamaño del producto esperado	Referencia
		5'-CAGTGCTCTACCTCCATCATT		
lsrRNA	Ent R	5'-CAGTGCTCTACCTCCATCATT	94 pb	US EPA Method 1609.1
	Ent R	[6-FAM]-5'-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA		
	Sonda hidrólisis			

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material a emplear debe estar estéril (tubos, tips, placas de Petri).

9.2. Es imprescindible limpiar la mesada de trabajo. Antes de comenzar la filtración, limpiar con etanol 70% y realizar esta etapa de análisis microbiológico aplicando la técnica aséptica. Antes de comenzar la extracción y amplificación limpiar las superficies con una solución de hipoclorito y luego enjuagar con agua desionizada.

9.3. Para evitar contaminaciones accidentales de ADN, el análisis molecular debe estar organizado y contenido en etapas metodológicas y siguiendo el flujo ¨hacia adelante¨ o de no retorno (forward flow) para el manejo de las muestras.

9.4. Trabajar en una zona limpia, libre de ADN, para preparar la mezcla de reactivos de PCR en tiempo real. De ser posible, trabajar en una cabina destinada para este fin, con desinfección UV de ADN/ARN. Encender la luz ultravioleta durante 15 minutos previo y posterior al uso.

9.5. Manipular los reactivos y las muestras en gradilla refrigerada. Los reactivos, en particular la ADN polimerasa, son sensibles al calor y su actividad puede verse afectada. Trabajar con la mayor celeridad posible.

9.6. Los reactivos como primers, sonda y mix deben ser alicuotados en volúmenes pequeños, consistentes con el uso del laboratorio, para minimizar contaminación de todo el stock.

9.7. El agua ultrapura estéril sobrante debe eliminarse. El re-uso del sobrante es una de las principales causas de contaminación de la mezcla de reacción.

9.8. Emplear set de pipetas y gradillas separadas para cada área de trabajo. Las pipetas y gradillas utilizadas en la preparación de la mezcla de reacción deben ser de uso exclusivo y no deben emplearse para hacer tomas de volúmenes de muestras u otros usos para evitar contaminaciones.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Realizar la extracción de ADN de *E. faecalis* con kit comercial DNeasy PowerWater o similar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Nota 1: Se pueden utilizar alícuotas almacenadas de extracciones de ADN anteriores.

10.2. A partir del ADN obtenido, se puede medir la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro UV o NanoDrop™. Registrar los resultados. La muestra es aceptable como estándar si la relación de lecturas DO_{260}/DO_{280} es > a 1,75. Calcule la concentración total de ADN como DO_{260} × 50 ng/µL. En forma alternativa se puede determinar la concentración de ADN con fluorómetro Qubit.

10.3. Calcular la concentración de la secuencia diana de *E. faecalis* en el extracto purificado, utilizando la concentración total de ADN. Según el tamaño del genoma de *E. faecalis*, el peso del genoma de una célula de *E. faecalis* se puede estimar en ~ 3.6 fg y hay cuatro copias del gen de interés por genoma en esta especie. La concentración de copias del gen de interés en la preparación estándar de ADN genómico de *E. faecalis* se puede determinar a partir de esta información y de su concentración total de ADN determinada espectrofotométricamente mediante la fórmula:

$$Copias\ del\ gen\ de\ interés/\mu L = \frac{ADN\ total\ (fg/\mu L)}{3{,}6\ fg/genoma}\ x\ \frac{4\ copias\ gen\ interés}{genoma}$$

10.4. Realizar la dilución inicial del ADN purificado y cuantificado con agua calidad biología molecular estéril según sea necesario, para lograr una concentración >106 copias gen interés/5 µL.

10.5. Realizar diluciones seriadas con agua calidad biología molecular estéril de forma tal de generar una curva estándar a partir de 104 a 100 copias gen interés/5 µL, realizando duplicado de cada punto de la curva.

10.6. Los valores de pendiente de la curva deben estar dentro del rango de 3,1 a 3,6 y la eficiencia de amplificación entre 80 y 120%. Se recomienda, los valores de R^2 de las regresiones deberían ser mayores o iguales 0,99.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

11.1 Preparación y extracción de ADN de *E. faecalis* para muestra de calibrador (control positivo)

a) Descongelar un tubo de suspensión de 1 mL de células de *E. faecalis* de concentración ~ 106 UFC (ver Anexo I como ejemplo para su preparación) y diluir en 99 mL de PBS para obtener una suspensión celular que contenga ~104 CFU/mL.

b) Preparar el sistema de filtración y filtrar 1 mL; lavar con unos 20 mL de PBS.

c) Realizar la extracción de ADN a partir del filtro. Rotular los tubos como extractos calibradores sin diluir, etiquetar tubos adicionales de 1,5 mL para diluciones si es necesario.

d) Refrigerar el ADN del calibrador hasta analizar. Puede conservarse de esta manera y reutilizarse para controlar distintos análisis hasta por 1 semana.

11.2 Preparación y extracción de ADN de *E. faecalis* para efecto matriz y matriz referencia

a) Transferir una alícuota de 1 mL de la suspensión celular de la sección 11.1 a (~104 CFU/mL) a 100 mL de la muestra de agua de río para preparar la muestra de matriz o a 100 mL de PBS para preparar la muestra de matriz de referencia.

Nota 2: Las muestras deben enriquecerse con las mismas suspensiones de células de E. faecalis que se utilizan para preparar muestras de calibrador.

b) Preparar el sistema de filtración, filtrar todo el volumen y lavar con PBS.

c) Realizar la extracción de ADN a partir del filtro.

d) Refrigerar el ADN hasta analizar. Puede conservarse de esta manera y reutilizarse para controlar distintos análisis hasta por 1 semana

Nota 3: El laboratorio debe realizar una evaluación del efecto matriz cuando se recibe por primera vez muestras de agua de una fuente que el laboratorio no ha analizado previamente. A partir de dos muestras recolectadas secuencialmente del mismo sitio, o diferentes alícuotas de la misma muestra de campo, una de las muestras servirá para evaluación del efecto matriz y se enriquecerá con E. faecalis ATCC 29212 de acuerdo con el procedimiento detallado en esta sección. La otra muestra permanecerá sin adulterar y se analizará para determinar la concentración ambiental de enterococos, para calcular las recuperaciones del efecto matriz.

Análisis de la muestra

A. Filtración

11.3 Armar el equipo de filtración de membrana y conectarlo al sistema de vacío.

11.4 Colocar asépticamente un filtro de policarbonato en la base del filtro y conectar el embudo a la base, de modo que el filtro de membrana quede entre el embudo y la base.

11.5 Agitar vigorosamente la botella de muestra 25 veces para homogeneizar.

11.6 Filtrar 100 mL de muestra. Enjuagar el embudo de filtración con 20 mL de PBS estéril. Apagar el vacío y retirar el embudo de la base del equipo de filtración.

Nota 4: Si los volúmenes de muestra de agua de 100 mL no se pueden filtrar dentro de un período de tiempo razonable (por ejemplo, ~15 min), está permitido filtrar un volumen de muestra de agua de 50 mL. Dejar registro en los resultados.

11.7 Transferir cada filtro a un tubo para extracción de ADN.

Nota 5: Una vez filtrada la muestra, se puede realizar la extracción de ADN inmediatamente, o almacenar el filtro a -20 °C por una semana o hasta tres meses a -80 °C.

B. Extracción ADN

11.8 Realizar la extracción de ADN, siguiendo el procedimiento brindado por el fabricante del kit.

11.9 Guardar el ADN refrigerado durante hasta 1 semana.

C. Preparación de la mezcla de reacción para la corrida de qPCR:

11.10 Descongelar alícuotas de primers, sondas y BSA de concentración 10 µM, 5 µM y 10 mg/mL respectivamente. Agitar en vórtex las soluciones de trabajo y bajar en microcentrífuga.

11.11 En un área limpia, y antes de manipular cualquier muestra que contenga ADN, preparar la mezcla de reacción en microtubo estéril de 1,5 mL, tal como se describe en la Tabla 1, utilizando micropipetas libres de ADN.

Reactivo	Volumen/reacción (µL)	Concentración final en la reacción
Master mix QuantiNOVA Probe 2x	12,5	1x
Primer Foward 748F 10 µM	2,5	1 µM
Primer Reverse 854R 10 µM	2,5	1 µM
Sonda de Hidrólisis 813P 5 µM	0,4	0,08 µM
BSA 10 mg/mL	0,45	0,18 mg/mL
Agua	1,65	-
Total (sin ADN):	20	-

Nota 6: Preparar una cantidad suficiente de mezcla de reacción para el número de reacciones que se analizarán por día, incluidos los estándares y controles, más al menos dos reacciones adicionales para contemplar diferencias por pipeteo. Tener en cuenta que las muestras, los estándares y controles se analizarán por duplicado.

11.12 Alicuotar 20 µL de la mezcla de reacción en tubos de 0,2 mL aptos para qPCR.

11.13 Cuando todos los tubos estén cargados, colocar 5 µL de agua calidad Real Time para hacer el NTC (Non Template Control) o 5 µL de las extracciones correspondientes.

11.14 Tapar bien todos los tubos de reacción y colocarlos cuidadosamente en el termociclador.

11.15 El ciclado térmico es el siguiente: una etapa inicial de desnaturalización a 95 ˚C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 ˚C y 60 segundos a 60 ˚C.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Cada control que debe ser realizado presentado en el punto 13 de este procedimiento, tiene un valor de referencia. Si los resultados observados para cualquier control son diferentes al valor esperado, se considerará si el análisis debe ser repetido.

12.2. Procesar los resultados de acuerdo al software del equipo.

12.3. Exportar los resultados a una planilla Excel para realizar las correcciones necesarias que permitan expresar el resultado como células equivalentes del calibrador (CCE) por 100 mL de muestra de agua filtrada. Puede tomarse la planilla brindada por la norma (https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/methods_1609-1-1611-1-calculation-spreadsheet-april-2015.xlsx).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1 **Control de blanco de proceso:** Se debe analizar un blanco de proceso. Cuando se filtran las muestras, se debe filtrar un volumen de 100 mL de PBS estéril y tratar como a una muestra. El laboratorio debe realizar análisis de control de blanco al menos uno para cada ejecución de PCR. Si se obtiene un valor Cq inaceptable (mayor que el límite de detección/cuantificación), se considerará que hubo una contaminación y se evaluará repetir el análisis con nuevos reactivos de trabajo.

13.2 **Control positivo:** Se debe incluir un control positivo todos los días en que se analizan las muestras. Deben analizarse de una a tres muestras de calibrador, que servirán como control positivo (ver punto 11.1).

13.3 **Recuperación:** Se debe realizar análisis de una muestra de matriz de referencia (PBS) y de una a tres muestras de calibrador todos los días en que se analizan las muestras (ver punto 11.2 y 11.1). Se debe calcular el porcentaje de recuperación (R) y comparar los resultados con los criterios de recuperación aceptados según validación o establecidos en el gráfico de control correspondiente.

Nota 7: Si el resultado cumple con el criterio de aceptación para la recuperación, el rendimiento es aceptable. Si el resultado cae fuera de los criterios de aceptación, el rendimiento del sistema es inaceptable y debe repetirse. Si continúa inaceptable debe identificar el problema antes de seguir el análisis.

Calcular en hoja adecuada en planilla brindada por la norma (ver punto 12.3).

13.4 **Control sin ADN molde o blanco de reacción (NTC):** Se debe analizar los NTC para asegurarse de que los reactivos de la mezcla maestra de PCR no estén significativamente contaminados. El laboratorio debe realizar análisis NTC para cada ejecución de PCR. Si el valor de Cq medio de las reacciones de NTC produce un valor que es mayor que el límite de detección/cuantificación del método, los análisis deben repetirse con nuevas preparaciones de stock de trabajo de la mezcla de reacción.

13.5 **Control de precisión:** Se debe analizar una muestra por duplicado cada vez que se analizan muestras. La desviación estándar relativa (RSD = desviación estándar dividida por la media, multiplicada por 100) de una muestra analizada por duplicado debe ser menor a los valores obtenidos en la validación, o los límites establecidos en el gráfico de control correspondiente.

13.6 **Efecto matriz:** Se debe analizar la recuperación de la matriz para cada matriz que llegue de una fuente de agua no analizada previamente. Se procesa y analiza a partir de dos muestras recolectadas del mismo sitio, o diferentes alícuotas de la misma muestra de campo. Una de las muestras servirá para evaluación del efecto matriz y se enriquecerá con *E. faecalis* ATCC 29212. La otra muestra permanecerá sin adulterar, y se analizará para determinar la concentración ambiental de enterococos (ver punto 11.2). Se debe calcular el porcentaje de recuperación (R) y comparar los resultados con los criterios de recuperación aceptados (ver Tabla 2 como ejemplo).

Nota 8: Si la recuperación cumple con los criterios de aceptación, el desempeño del sistema es aceptable, entonces el análisis de muestras de campo de esta matriz puede continuar. Si no cumple, los resultados pueden deberse a que la matriz interfiere.

Calcular en hoja adecuada en planilla brindada por la norma (ver punto 12.3).

Tabla 2. Criterios de aceptación tomados de validación multilaboratorios
(U.S.EPA, 2015. Method 1609.1)

Matriz	Media del % recuperación	Rango aceptación (%)
Fresh water	124	(-48) - 415
Marine water	63	3 - 142

13.7 **Curva estándar:** Se debe generar una curva estándar en cada corrida o mínimamente con cada nuevo lote de sonda. Ver especificaciones en el punto 10. Se acepta si cumple con los valores establecidos en el punto 10.6.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Fecal Enterococci 9230 A. Introduction y E. Quantitative PCR for Enterococci. pp. 1192-1193, 1199-1203.

14.2. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

14.3. Haugland, R.A., S. Siefring, J. Lavender, and M.Varma, 2012. Influences of Sample Interference and Interference Controls on Quantification of Enterococci Fecal Indicator Bacteria in Surface Water by the qPCR Method. Water Research, 46(18):5989–6001.

14.4. Haugland, R.A., S. Siefring, M. Varma, A.P. Dufour, K.P. Brenner, T.J. Wade, E. Sams, S. Cochran, S. Braun, and M. Sivaganesan. 2014. Standardization of Enterococci Density Estimates by EPA qPCR Methods and Comparison of Beach Action Value Exceedances in River Waters with Culture Methods. J. Microbiol. Methods. 105:59-66.

14.5. Manual de equipo Real Time PCR.

14.6. U.S. EPA, 2015a. Method 1609.1: Enterococci in water by TaqMan® quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay with internal amplification control (IAC) assay. EPA-820-R-15-009. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.

14.7. U.S. EPA, 2015b. Method 1611.1: Enterococci in water by TaqMan® quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay. EPA-820-R-12-008. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.

5081UY

Detección de *Salmonella spp.* en muestras de residuos sólidos, destinadas a ser usadas como mejoradores de suelo

Técnica cualitativa - qPCR

Elaborado - A. Sanabria

Modificado - I. Pandulli

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la detección de *Salmonella spp.* en muestras de residuos sólidos destinadas a ser usadas como mejoradores de suelos, mediante la combinación de técnicas tradicionales y moleculares, que permiten obtener resultados en 72 h. El límite de detección ($eLOD_{50}$) es de ≤4 UFC/25 g de residuo sólido.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.
2.5. Procedimiento: ¨Extracción de ADN con kit comercial¨(5082UY).
2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16).
2.7. Procedimiento de control de calidad para análisis bacteriológicos (PGC 07).
2.8. Procedimiento manejo de cepas (PGC 24).
2.9. Instructivos de uso autoclave vertical (INE 13).
2.10. Instructivo de uso balanza (INE 16).
2.11. Instructivo de uso desionizador (INE 82).
2.12. Instructivo de uso analizador de iones (INE 98).
2.13. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 44).
2.14. Instructivo de uso incubadora 35 °C (INE 46).
2.15. Instructivo de uso de centrifuga (INE 124).
2.16. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 145).
2.17. Instructivo de uso de termociclador a tiempo real (INE 149).
2.18. Instructivo para la digitalización y respaldo de datos de equipos analíticos (INC 23).
2.19. Instructivo de uso de cuba electroforesis (INE 150).
2.20. Rutas de análisis de detección de Salmonella (RMB 17).
2.21. Ruta para preparación de reactivos de biología molecular (RPR 25).
2.22. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El género *Salmonella* está compuesto de 7 grupos filogenéticos, que habitualmente se clasifican en dos especies: *Salmonella entérica y Salmonella bongori*. La mayoría de las cepas de *S. entérica* son patógenos entéricos. Los residuos sólidos de la categoría II pueden ser usados como mejoradores de suelo, pero deben demostrar la ausencia de éste patógeno.

3.2. Este método combina las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento de la microbiología clásica, con una etapa de detección-confirmación que se realiza por técnicas moleculares: se extrae ADN a partir del caldo de enriquecimiento y se detecta al patógeno por qPCR, con primers específicos. Estos están dirigidos al locus ttr, cuyos genes codifican para proteínas que permiten que la bacteria emplee el tetrationato como aceptor final de electrones (respiración del tetrationato).

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. La manipulación de la muestra y el análisis deben ser realizados utilizando túnica, anteojos de protección y guantes descartables, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

4.2. Usar la túnica específica del área de trabajo para las reacciones de amplificación de ADN y guantes sin talco.

4.3. Las técnicas moleculares son muy sensibles a la contaminación: para evitar contaminaciones cruzadas se debe trabajar con un flujo de no retorno.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La presencia de tóxicos orgánicos, como fenoles, en la matriz residuos sólidos, junto con una baja densidad de Salmonella spp., pueden afectar la recuperación del microorganismo.

5.2. Las reacciones de amplificación del ADN pueden verse inhibidas por talco, polvo, restos de material vegetal (carbohidratos complejos, almidón), restos de reactivos de la extracción de ADN (fenol, CTAB, guanidina de las columnas de purificación, etc.). Es recomendable asegurar la pureza y calidad del ADN a emplear, así como la higiene de las superficies y las pipetas a emplear.

5.3. Si la cantidad de ADN de la muestra es excesiva, se puede ver inhibida la reacción de amplificación. Se puede cuantificar el ADN y realizar diluciones pertinentes si es necesario (trabajar con un máximo de 50-20 ng de ADN por reacción).

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se deben colectar al menos 100 g de residuo sólido en bolsa tipo WhirlPak estéril.

6.2. El tiempo entre la toma de la muestra y su análisis debe ser el menor posible. Se aconseja procesar la muestra el mismo día de obtenida. Si esto no es posible por razones prácticas, la muestra debe ser almacenada en oscuridad y a una temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). El período máximo de conservación de la muestra es de 24 h.

6.3. El ADN extraído se puede mantener a ≤ -20 °C, luego del análisis de la muestra, durante 28 días. Posteriormente, puede ser reservado por Laboratorio Ambiental, ya que puede servir de insumo para constituir una colección nacional, útil para estudios prospectivos de interés.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanzas de resolución 0,01 g
7.2. Autoclave
7.3. Mecheros
7.4. Bolsa estéril, por ejemplo tipo Whirl-Pak
7.5. Material de vidrio para preparación del medio de cultivo.
7.6. Incubadora a 35 °C
7.7. Heladera a 2-8 °C
7.8. Freezer ≤ -20 °C
7.9. Ansas
7.10. Placas de Petri estériles, de plástico descartables (o de vidrio) de 90 mm de diámetro
7.11. Cinta de revelado de autoclave
7.12. Desionizador de agua
7.13. Equipo para obtención de agua ultrapura
7.14. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)
7.15. Cabina de preparación de la PCR
7.16. Minifuga
7.17. Vortex
7.18. Juego de micropipetas de 200- 1000 µL y de 10 mL para uso microbiológico
7.19. Juego de micropipetas de 200- 1000 µL, 20-200 µL, 2 – 20 µL para uso exclusivo de reactivos NO ADN
7.20. Pipeta 0,2-2 µL para uso exclusivo de ADN
7.21. Tips estériles
7.22. Tubos eppendorff de 1,5 mL estériles
7.23. Tubos de vidrio con capacidad para 50 mL (tipo doble concentración, 2 cm de diámetro)
7.24. Tubos de PCR ópticamente adecuados, estériles
7.25. Termociclador a tiempo real
7.26. Centrífuga con rotor adecuado para eppendorf, que tenga la capacidad de alcanzar velocidades de 10000 xg
7.27. Cuba de electroforesis

8. REACTIVOS

8.1. Etanol 70%
8.2. Agua desionizada (según ES 01)
8.3. Caldo Agua de Peptona Buffereada
8.4. Caldo Tetrationato base Hajna
8.5. Cristales de iodo Nro. CAS 7553-56-2
8.6. Ioduro de potasio Nro. CAS 7681-11-0
8.7. Agua ultrapura estéril, alicuotada en tubos de 1,5 mL (según ES 01).
8.8. Kit de extracción de ADN de columna (membrana de sílice).
8.9. Mix de reacción de PCR con sonda, que incluya buffer de reacción, dNTP, ADN polimerasa Hot Start, cloruro de magnesio (tipo Quantinova, Quagen)
8.10. Sistemas de primers y sonda molecular beacon según Tabla 1
8.11. Cepa de referencia: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Typhimurium ATCC14028 para control positivo de proceso
8.12. Cepa de referencia: *E. coli* ATCC25922 para control negativo del proceso
8.13. ADN de *Salmonella spp*. para control positivo de la reacción de amplificación, extraído a partir de la cepa de referencia

Tabla 1: Sistema de primers y sonda a emplear:

Secuencia target	Nombre Primer/ sonda	Secuencia	Tamaño del producto esperado	Referencia
		5´- CTCACCAGGAGATTACAACATGG -3'		
ttrBCA	ttr6	5´-AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC -3'	95 bp	Environ. Sci. Technol. 2011, 45, 8996–9002
	ttr4	HEX 5'-CCAGGCGACCGACTTTTAGCCACT GACGAGCCTGG -3' DABCYL		
	ttrProbe			

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Todo el material a emplear debe estar estéril (bolsas, tubos, puntas, placas de Petri).

9.2. Es imprescindible limpiar la mesada de trabajo, al iniciar el análisis, con etanol 70% y realizar el análisis microbiológico entre dos mecheros, para mantener lo mejor posible las condiciones de esterilidad.

9.3. Para evitar contaminaciones accidentales de ADN, la detección molecular de *Salmonella spp.* debe estar organizada y contenida en etapas metodológicas y siguiendo el flujo ¨hacia adelante¨ o de no retorno (forward flow) para el manejo de las muestras.

9.4. Las áreas de trabajo deben estar espacialmente separadas. Se recomienda la preparación de la mezcla de reacción en una cabina con lámpara UV destinada para tal fin, exclusivamente. El ADN se debe cargar en un área físicamente separada.

9.5. Previo al inicio del trabajo, dejar el material plástico estéril y las micropipetas expuestas durante 15 minutos al UV de la cabina de preparación de la reacción.

9.6. Los reactivos, en particular la ADN polimerasa, son sensibles al calor. La mezcla de reacción debe realizarse en frío, pues la enzima puede perder actividad, y con la mayor celeridad posible.

9.7. El agua ultrapura estéril sobrante debe eliminarse. El re-uso del sobrante es una de las principales causas de contaminación de la mezcla de reacción.

9.8. No se debe emplear las pipetas de toma de volúmenes de reactivos para cargar ADN, ya que puede ser una fuente de contaminación. Las pipetas para preparar la mezcla de reacción son de uso exclusivo y no deben emplearse para hacer tomas de volúmenes de muestras de otra índole, por los mismos motivos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Se extrae ADN a partir de la cepa de referencia *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028.

10.2. Se puede visualizar en gel. Se puede cuantificar espectrofotométricamente a 260 nm en cuveta de quarzo con pase óptico de 10 mm. La concentración de ADN genómico se calcula según:

$$[ADN]\ ng/\mu L = Abs_{260} * FD * 50$$

siendo

Abs_{260} la lectura espectrofotométrica en unidades de absorbancia a 260 nm

FD el factor de dilución de la muestra en agua libre de DNAsas

50 factor de corrección

Nota 1: Se puede cuantificar el ADN con otras metodologías, por ej. fluorométricamente.

10.3. Se recomienda verificar la calidad del ADN, considerando las siguientes relaciones de absorbancia:

- 260/280 nm se aceptan valores en el rango 1,8 a 2,0
- 260/230 nm se aceptan valores en el rango 2,0 – 2,2

Nota 2: para profundizar en este aspecto, ver el SOP 5082UY Extracción de ADN de bacterias con kit comercial

10.4. Se lleva el ADN a una concentración de 10 ng/µL. Se lo considera la dilución 0. A partir de esta dilución, se realizan al menos 6 diluciones seriadas en base 10, para cubrir el rango dinámico de 1 a 0,000001 ng/µL. Se analiza de acuerdo a los puntos 11.19 a 11.25 de este procedimiento.

10.5. Se preparará una curva de calibración anual o cada 50 muestras, analizando cada punto al menos por duplicado. Se acepta como eficiencia de la reacción un rango de 80 a 120 %. El rango normalizado entre duplicados no debe superar el 15%. El r^2 de la ecuación de la recta debe ser >0,98. Idealmente, la separación entre un punto y el siguiente de la curva de calibración es de 3,3 Cq.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

Preparación del Agua de Peptona Buffereda (BPW)

11.1. Adicionar 20 g de peptona a 1000 mL de agua desionizada, y disolver agitando.

11.2. Precintar la tapa del recipiente con cinta de revelado de autoclave y esterilizar en autoclave.

11.3. Almacenar en heladera hasta un máximo de 3 meses.

Preparación Caldo Tetrationato base Hajna

11.4. Adicionar 45,75 g de caldo tetrationato a 480 mL de agua desionizada, y disolver agitando.

11.5. Calentar con agitación frecuente y hervir por 1 minuto hasta que se disuelva completamente. NO SE AUTOCLAVA. Este es el caldo base.

11.6. Enfriar a 45-50°C aproximadamente. Justo antes de emplear, agregar 20 mL de la solución de iodo a los 480 mL del caldo base.

11.7. Preparar la solución de iodo de la siguiente forma: se pesan 2,46 g de Iodo Nro. CAS 7553-56-2 y 4 g de Ioduro de Potasio Nro. CAS 7681-11-0. Se disuelven en 20 mL de agua desionizada estéril.

11.8. Repartir 22,5 mL en tubos estériles con capacidad para 50 mL.

11.9. El caldo base puede almacenarse en heladera hasta 2 semanas, pero una vez agregada la solución de iodo debe usarse en el mismo día.

Análisis de la muestra

Pre enriquecimiento y enriquecimiento

11.10. Pesar 25 ± 0,2 g de muestra (como se recibe) directamente en una bolsa de Whirl-Pak estéril.

11.11. Agregar 225 mL de Agua de Peptona Buffereada y mezclar por 60 s a 150 rpm.

11.12. Incubar a 35 ± 1 °C, por 22 ± 2 h.

11.13. Luego de incubar, homogeneizar manualmente, mezclando gentilmente.

11.14. Transferir asépticamente 2,5 mL del homogeneizado al tubo de Caldo Tetrationato Base Hajna.

11.15. Incubar a 35 ± 1°C, por 22 ± 2 h.

11.16. Vortexear el tubo de 5 a 10 s.

11.17. Extraer ADN de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante del kit de extracción (ver SOP 5082UY).

11.18. Por cada batch de análisis, se deben incluir los controles explicitados en el capítulo 13 de este procedimiento, exceptuando el control negativo de proceso, que se realizará con frecuencia anual.

Detección y confirmación por Q-PCR

11.19. En la **zona exclusiva para reactivos** (preferentemente en cabina para PCR), fundir en hielo la mezcla de reacción (por ejemplo 2x QuantiNova Probe PCR Kit), los primers, la sonda y agua ultrapura estéril. Mezclar las soluciones individuales, inclinando suavemente los tubos hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Realizar un centrifugado rápido a cada tubo a los efectos de lograr una adecuada mezcla de reactivos.

11.20. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la Tabla 2. Planificar al menos 2 reacciones por cada muestra (duplicados), incluyendo un blanco de reactivos de PCR o Non Template Control (NTC) y un positivo de ADN. Preparar al menos un 10% adicional de la mezcla de reacción para paliar los errores de pipeteo cuando se alicuota la mezcla en los tubos de PCR.

11.21. Vortexear la mezcla de reacción y dispensar 23 µL en los tubos de PCR.

Componente	x1 reacción (en µL)
2x QuantiNova	12,5
Primer F ttr6 5 µM *	2
Primer R ttr4 5 µM *	2
Sonda 5 µM ł	1
Agua ultrapura estéril	5,5
Volumen final	25

* Concentración final 0,4 µM

ł Concentración final 0,2 µM

11.22. Cargar 2 µL del agua de reacción en el NTC.

11.23. Fuera de la cabina de preparación, en la zona exclusiva para ADN, fundir en hielo el ADN de las muestras y ADN control. Con una pipeta exclusiva para uso de ADN, agregar 2 µL de molde de ADN.

Nota 3: se sugiere emplear como ADN control un ADN de concentración conocida, por ejemplo 1 ng/µL, para que actúe como calibrador.

11.24. El ciclado térmico es el siguiente:

Desnaturalización inicial	40 ciclos		
95 °C	95 °C	60 °C *	
2 min	5 s	5 s	

* adquisición de la fluorescencia

11.25. La adquisición se hace en el paso de extensión (60°C). Para el fluorosforo HEX, el máximo de absorción es de 538 nm y el máximo de emisión es de 555 nm. Se grafica la señal de fluorescencia vs. el número de ciclos. A partir de una curva de calibración de ADN, se fija el umbral y se interpola el Cq de las muestras.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Cada control que debe ser realizado presentado en el punto 13 de este procedimiento, tiene un valor de referencia. Si los resultados observados para cualquier control es diferente al valor esperado, se considerará si el análisis debe ser repetido.

12.2. Si los resultados observados para los controles son los esperados, cualquier valor de muestra cuyo Cq sea menor o igual el límite de detección instrumental será considerado como positivo, y se reportará como ¨*Salmonella spp*. detectada en 25 g de muestra¨.

12.3. Si los resultados observados para los controles son los esperados, y el valor de Cq de la muestra está por debajo del límite de detección instrumental, se deberá repetir la amplificación empleando diluciones de la muestra (1/5; 1/10), ya que en ocasiones grandes cantidades de ADN o inhibidores de la matriz pueden impedir la amplificación. Es recomendable además visualizar el ADN genómico en un gel de agarosa al 1% y cuantificarlo. Si luego de estas consideraciones, el valor de la muestra sigue estando por debajo del límite de detección instrumental, será considerado como negativo y se reportará ¨*Salmonella spp*. no detectada en 25 g de muestra¨.

12.4. El límite de detección instrumental se fija de acuerdo a los valores obtenidos en la curva de calibración durante la etapa de validación.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Cada vez que se analiza una muestra:

13.1. **Blanco de proceso:** Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en 225 mL de Agua de Peptona Buffereada. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser negativa o tener valores de C_q superiores al límite de detección instrumental. Los datos de este control se emplearán para realizar un gráfico de control.

13.2. **Control positivo de proceso:** Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en 225 mL de Agua de Peptona Buffereada, con una ansada de *Salmonella spp*. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser positiva (valores de C_q menor o igual al límite de detección instrumental).

13.3. **Fortificación de una muestra:** Se realiza una muestra por duplicado, y a uno de los duplicados se le agrega una ansada de *Salmonella spp*. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser positiva (valores de C_q menor o igual al límite de detección instrumental). Un resultado negativo indica que existe inhibición de la matriz en el crecimiento y/o de extracción de ADN.

13.4. **Non Template Control (NTC) o Blanco de PCR:** se incluye por duplicado un blanco de reactivos de PCR. La detección por PCR debe ser negativa o tener valores de Cq superiores al límite de detección instrumental.

13.5. **Control positivo de PCR:** incluir un ADN de *Salmonella spp.* de concentración conocida. La detección por PCR debe ser positiva (valores de C_q menor o igual al límite de detección instrumental).

13.6. El rango normalizado entre los duplicados de la PCR no debe superar el 15%. En caso de que así sea, se evaluará la pertinencia de repetir la muestra.

En forma anual:

13.7. **Control negativo de proceso:** Se inoculan 25 mL de agua desionizada estéril en 225 mL de Agua de Peptona Buffereada, con una ansada de *E. coli*. Se trata como si fuera una muestra. La detección por PCR debe ser negativa. La especificidad del sistema ha sido debidamente probada en bibliografía y verificada durante la validación. Por estas razones, realizar este control con una frecuencia anual.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. TMECC 07.02-B. Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2001

14.2. Jyoti A., Vajpayee P., Singh G., Bali Patel C., Chand Gupta K., Shanker R. Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of Salmonella Typhimurium by Quantitative Polymerase Chain Reaction. 2011. Environ. Sci. Technol. 45: 8996–9002 dx.doi.org/10.1021/es2018994

5082UY

Extracción de ADN con kit comercial

Elaborado - I. Pandulli

Modificado - I. Pandulli

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la extracción de ADN a partir de medios de cultivo, filtros microbiológicos y/o muestras ambientales.

1.2. El ADN extraído se puede utilizar para análisis de PCR u otros diversos tipos de ensayos; se puede mantener a ≤ -20 °C, durante el tiempo que se requiera. Puede servir de insumo para constituir una colección nacional, útil para estudios prospectivos de interés.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento de control de calidad para análisis microbiológicos (PGC 07).

2.6. Procedimiento de limpieza de materiales (PR 16).

2.7. Procedimiento manejo de cepas (PGC 24).

2.8. Instructivos de uso autoclaves verticales (INE 13).

2.9. Instructivo de uso balanza (INE 16).

2.10. Instructivo de uso agitador vórtex (INE 147).

2.11. Instructivo de uso incubadora (INE 46).

2.12. Instructivo de uso de centrifuga (INE 124).

2.13. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 135, INE 145, INE 146).

2.14. Instructivo para extracción de ADN (protocolo brindado por el fabricante del kit de extracción).

2.15. Instructivo de uso de cuba electroforesis (INE 150).

2.16. Rutas de análisis para Extracción de ADN (RMB19).

2.17. Ruta para preparación de reactivos de biología molecular (RPR 25).

2.18. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. En los kits comerciales de extracción de ADN de columna (membrana de sílice), se homogeniza la muestra en un tubo con perlas, lo que facilita la lisis celular (por colisión mecánica con las perlas y la disrupción química de las membranas celulares). Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna, se adiciona una solución que facilita la retención del ADN a la membrana. Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana, y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y centrifugación, mientras que el material genético permanece unido. Para liberar al ADN de la matriz de la columna, la membrana y el ADN se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación. Posteriormente, se adiciona agua o un buffer en el centro de la membrana. En este paso, el ADN se hidrata. Se centrifuga para recuperarlo de la matriz y re-suspenderlo.

3.2. En los insertos proporcionados por el fabricante se detallan, además de los pasos a seguir en cada caso, la cantidad de muestra recomendada y el rendimiento esperado.

3.3. Una vez obtenido el material genético, se puede determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. El ADN absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Además, se puede estimar la pureza a través de las relaciones 260/280 nm que indica los restos de proteínas; y la 260/230 nm que indica los restos de reactivos, sales, etc. que interfieren en las reacciones posteriores.

3.4. Es importante conocer si el ADN obtenido es integro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. La manipulación de las muestras debe ser realizada utilizando túnica, guantes descartables y lentes de seguridad, a fin de evitar el riesgo de contraer enfermedades.

4.2. Las soluciones brindadas por los kits pueden contener clorhidrato de guanidina, susceptible de formar compuestos muy reactivos cuando se combina con hipoclorito. Si se derrama algún líquido que contenga estas soluciones, limpiarlo con agua y un detergente adecuado. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpiar primero la zona afectada con agua y detergente de laboratorio y seguidamente con hipoclorito sódico al 1% (v/v). En este último caso, descartar los elementos de limpieza como material contaminado.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Los kits comerciales contienen soluciones con sus pH específicos, pero si se utiliza en algún paso agua, debe medirse su pH. Debe ser cercano a 7,0 para evitar la degradación del ADN.

5.2. La presencia de poco ADN en la muestra puede afectar la recuperación del ADN del microorganismo. Con los kits comerciales se obtienen en su mayoría moléculas de ADN integras, pero el rendimiento es menor que por métodos de extracción tradicional.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Se parte para la extracción de un medio de cultivo inoculado y con crecimiento, o de una muestra de interés. Se realiza la extracción luego de incubar el medio en las condiciones requeridas en los ensayos específicos, o a partir de la muestra directamente.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanzas de resolución 0,01 g
7.2. Autoclave
7.3. Mecheros
7.4. Material de vidrio para preparación del medios de cultivo, geles de agarosa,etc
7.5. Tubos estériles
7.6. Incubadora a 35 °C
7.7. Heladera a 2-8 °C
7.8. Freezer a $\leq$-20 °C
7.9. Destilador de agua
7.10. Desionizador de agua
7.11. Vórtex
7.12. Pipeta de 100 µL y 1000 µL.
7.13. Tips estériles
7.14. Tubos eppendorff de 1,5 mL estériles
7.15. Centrífuga con rotor para eppendorf
7.16. Espectrofotómetro
7.17. Cubeta de cuarzo de paso óptico de 0,1 cm
7.18. Cuba de electroforesis
7.19. Plancha calefactora con agitador magnético

8. REACTIVOS

8.1. Etanol 70%
8.2. Agua ultrapura estéril, alicuotada en tubos de 1,5 mL (grado 3, según ISO 3696 en su versión vigente).
8.3. Kit comercial de extracción de ADN, por ejemplo Quick-DNA Fungal/Bacterial kit, Zymo Research (Nro. Cat. D6005)
8.4. Reactivos extras que requiera el kit a utilizar, por ejemplo dimetilsulfóxido Nro. CAS 67-68-5
8.5. Agarosa Nro. CAS 9012-36-6
8.6. Azul de carga
8.7. Marcador de peso molecular
8.8. Agente intercalante
8.9. EDTA disódico Nro. CAS 6381-92-6. Se requiere a una concentración de 0,5 M. Para ello, disolver 18,61 g de EDTA disódico en 100 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8,0 $\pm$ 0,2.
8.10. Tris Nro. CAS 77-86-1
8.11. Ácido bórico Nro. CAS 10043-35-3
8.12. Buffer TBE 10x. Se prepara disolviendo 108 g de Tris, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA disódico 0,5 M en 750 mL de agua desionizada. Luego, llevar a 1000 mL de volumen final, agregando agua en cantidad necesaria. Almacenar a temperatura ambiente.
8.13. Gel de agarosa 1%. Pesar 1 g de agarosa. Disolver en 100 mL Buffer TBE 0,5x (dilución 1/20 de Buffer TBE 10x). Fundir en plancha calefactora con agitación hasta ebullición. Dejar enfriar hasta que llegue a aproximadamente 50 °C (no debe quemar al tocar). Agregar el agente intercalante de acuerdo con las indicaciones del fabricante (típicamente, 2-3 µL por cada 100 mL de gel). Colocar en el molde con el peine adecuado y dejar solidificar, sin exponerlo a la luz directa.
8.14. NaOH 1 N para ajustar pH.
8.15. HCl 1 N para ajustar pH.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Para evitar que se degrade el ADN, todo el material a emplear debe estar libre de ADNasa. Una forma de lograrlo es esterilizando.

9.2. Es imprescindible limpiar la mesada de trabajo al iniciar el análisis con alcohol 70% (etanol).

9.3. La extracción de ADN es el paso principal para análisis posteriores. La contaminación con ADN no target, ARN exógeno, y/o ADNasas es el principal riesgo. Se debe utilizar túnica y guantes descartables, que deben ser descartados luego de cada análisis o con mayor frecuencia si es necesario. Cambie las puntas entre muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas

11.1. Preparación de medios de cultivo. Previo a la extracción se debe preparar el medio de cultivo de interés, adecuado para el crecimiento de microorganismo target. El medio debe prepararse y esterilizarse según las instrucciones del fabricante que se encuentran en el envase. Dejar registro en la ruta de preparación de medios.

11.2. Inoculación. El día previo a la extracción, si corresponde, se inoculan cepas puras o matrices en los medios de cultivo. Se incuban de acuerdo a lo estipulado en el protocolo de interés.

Nota 1: En algunos casos será necesario extraer ADN a partir de la matriz directamente, sin incubarla previamente. Por ej. ADN para realizar un estudio metagenómico de sedimentos de un río.

11.3. Transferir 1,5 mL de muestra líquida a un tubo eppendorf. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min. Descartar el líquido y agregar agua desionizada. Resuspender y volver a centrifugar en iguales condiciones. Remover completamente el líquido con la ayuda de una micropipeta. Repetir este paso cuantas veces sea necesario para obtener el peso de pellet indicado por el fabricante del kit.

Análisis de la muestra.

11.4. Extracción ADN: realizar la extracción de ADN de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit comercial.

11.5. Visualización ADN: luego de finalizar, se puede observar el ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8- 1%. Para ello, correr en Buffer TBE 0,5x, durante 30 minutos, a 100 volts. Se incluye un marcador de peso molecular que sirve como guía del peso molecular.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. No aplica.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Estos controles de calidad se llevarán a cabo solo si son requeridos para el uso posterior del ADN, por ejemplo, si se desea clonar o secuenciar al ADN. En análisis microbiológicos de rutina, estos controles pueden ser omitidos solo si los controles de proceso y las muestras fortificadas se comportan de acuerdo a lo esperado.

13.1. Integridad: La integridad del ADN genómico se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN genómico está íntegro y sin restos de ARN, se debe observar una banda única de alto peso molecular. Si está fragmentado, se observará una banda de más de 1 cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (smear). Si se observa una banda estrecha a bajo peso molecular, se puede tratar de contaminación con ARN, que habla de una incorrecta extracción de ADN genómico. Restos de ARN y el ADN fragmentado pueden dificultar la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular, y la reproducibilidad de las técnicas.

13.2. Rendimiento: Las bases nitrogenadas del ADN absorben la luz ultravioleta (UV) a 260 nm. Esto permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Para ADN genómico se puede calcular la concentración según lo siguiente:

$$[ADN]\ ng/\mu L = Abs_{260} * FD * 50$$

siendo

Abs_{260} la lectura espectrofotométrica en unidades de absorbancia a 260 nm

FD el factor de dilución de la muestra en agua libre de DNAsas

50 factor de corrección

13.3. Para estimar si el ADN se encuentra contaminado por proteínas o residuos químicos, se consideran las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm.

- Relación 260/280 nm. El triptófano es un aminoácido aromático que absorbe a 280 nm, por lo que se emplea este valor como indicador de contaminación por proteínas. Un valor entre 1,8 a 2,0 es aceptado como ADN puro. Valores menores indican la presencia de proteínas.
- Relación 260/230 nm. Indica la existencia de contaminación causada por componentes orgánicos o agentes caotrópicos, que absorben a 230 nm (carbohidratos, fenol, guanidina por ejemplo). Se considera aceptable el rango 2,0 – 2,2. Si la relación es menor, indica la presencia de contaminantes.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA. Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples October 2004

14.2. Manual del kit QIAGEN

14.3. https://www.zymoresearch.com/pages/dna

14.4. https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis.html

14.5. https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/tae-and-tbe-running-buffers-recipe

SECCIÓN 6
Ecotoxicológicos

6159UY

Evaluación de la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales líquidas mediante el test de bacterias luminiscentes (Sistema Microtox®)

Elaborado - G. Pistone

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para evaluar la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales incluyendo aguas residuales domésticas e industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, solución resultante del test de lixiviación de residuos sólidos industriales, mediante el Sistema Microtox®. Este es un bioensayo normalizado, que emplea como organismo indicador una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Aliivibrio fischeri*.

1.2. Los resultados se informan como IC_{50} entre 0 y 100 %.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: “Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad” (6201UY).

2.6. Instructivos de uso de fotómetro Microtox® modelo 500 (INE41).

2.7. Instructivos de uso de analizador de pH (INE98).

2.8. Instructivo de uso desionizador Millipore Elix Essential (INE121).

2.9. Instructivos de uso de balanza analítica (INE94).

2.10. Instructivos de uso de centrífuga (INE 49).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

2.12. Rutas de análisis (RET 03).

2.13. Registro de preparación de reactivos (RPR 15), y de preparación de solución control (RPS 10).

2.14. Instructivo determinación de cloro total (INC 22).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Es un bioensayo estandarizado a nivel internacional, que emplea como organismo a testear una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Aliivibrio fischeri*, la cual se encuentra registrada en el NRRL (Agriculture Reseach Service Culture Collection) como B-11177. Para el ensayo se emplea una densidad de bacterias viables de 106 cél/mL.

3.2. Bajo condiciones adecuadas el microorganismo emplea aproximadamente 10 % de su energía en una vía metabólica que produce luz. Este hecho está intrínsecamente vinculado a la respiración del mismo. Cualquier alteración del ritmo respiratorio, debida a un cambio en el metabolismo o a daños en la estructura celular, causará decrecimiento de la luminiscencia.

3.3. La toxicidad aguda se expresa través del parámetro IC_{50} que indica la concentración capaz de inhibir en un 50 % la emisión de luz en un tiempo dado. Se puede medir la inhibición a los 5, 15, o 30 minutos, en cuyos casos el parámetro se denomina IC_{50} (5 min), IC_{50} (15 min), IC50 (30 min). IC_{50} (15 min) es el tiempo de análisis usualmente utilizado. Para medir el decrecimiento en la luminiscencia se utiliza un fotómetro Microtox® modelo 500, el cual mide la luz remanente a una longitud de onda de 490 nm.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El analista debe utilizar equipo de seguridad apropiado (guantes descartables, lentes y túnica) de acuerdo a la naturaleza de la muestra bajo estudio.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Elevada turbidez en las muestras, puede reducir la transmisión de luz e incrementar la toxicidad estimada. En este caso centrifugar la muestra a 4000 r/min durante 30 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo recipiente limpio y etiquetado, y realizar el test con dicha fracción de la muestra.

5.2. **pH.** Las bacterias son sensibles al pH, pero el efecto es mínimo dentro del rango 6,0 - 8,0. Realizar el test sin ajustar el pH de la muestra para determinar el efecto tóxico total. Si el pH de la muestra es menor a 6,0 o mayor a 8,0, es aconsejable determinar también la toxicidad de la muestra sin el efecto del pH, es decir, ajustando el pH dentro del rango 6 - 8 con HCl o NaOH según corresponda (idealmente entre 6,5-7,5), y realizando nuevamente la determinación analítica. En estos casos, se deberá mencionar en el informe de resultados. Cuando el pH sea extremo (mayor a 11 o menor a 4), donde la sobrevivencia de las bacterias se encuentra seriamente comprometida, basta realizar un test screening para comprobar la toxicidad de la muestra y reportarla como Muy tóxica.

5.3. **Oxígeno disuelto.** No se requiere aireación de la muestra. Bajos niveles de oxígeno en agua no afectan los resultados del test. La manipulación normal de las muestras, y las diluciones al 50 % con soluciones aireadas se considera suficiente para proveer de oxígeno adecuado para el test, a pesar de la deficiencia de la muestra en oxígeno. A su vez la aireación puede determinar la pérdida de sustancias volátiles de la solución, así como incrementar la tasa de oxidación y degradación de sustancias presentes en la muestra, cambiando de esta forma su toxicidad.

5.4. **Color.** Muestras altamente coloreadas (particularmente aquellas en los tonos rojos o marrones), pueden presentar interferencia con la transmisión de la luz, y por ende con la medida de toxicidad. Si la muestra posee color detectado a simple vista, realizar el test básico y determinar la IC_{50} de la misma. De observarse toxicidad en la muestra, comprobar si a esta concentración la muestra tiene color visible. Si se detecta color visible, realizar el protocolo de corrección de color descrito en el Anexo 1.

5.5. **Muestras cloradas.** Las bacterias, al igual que la mayoría de los microorganismos, son sensibles al cloro, por lo que, de ser necesario, neutralizar el cloro residual con sulfito de sodio. La determinación de la existencia original de cloro en la muestra se realiza según el INC 22. Las muestras que contienen cloro residual se deben dejar por una o dos horas a la luz para disiparlo. Luego, proceder como sigue:

a. Tomar 100 mL de la muestra a analizar en un Erlenmeyer de 250 mL.

b. Adicionar 1,0 mL de ácido acético 1 + 1, o 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 + 50 (1 mL de ácido en 50 mL de agua desionizada).

c. Adicionar 1,0 mL de solución de KI. Si luego de agregar el KI la solución vira a color amarillo, continuar con el procedimiento. Si no se observa el viraje, no continuar y registrar la observación.

d. Titular con solución de Na2SO3 hasta que casi desaparezca el color amarillo de la solución. Añadir a continuación 1 mL de solución de almidón y continuar la titulación hasta su punto final, indicado por la desaparición del color azul.

e. Registrar el gasto total de solución de Na_2SO_3.

f. Adicionar la cantidad de Na_2SO_3 necesaria para neutralizar el cloro residual, de acuerdo a la valoración arriba descripta. El volumen a adicionar de solución de Na_2SO_3 se calcula de la siguiente manera:

$$VNa_2SO_3 = \frac{(GNa_2SO_3 \times Vmuestra)}{100}$$

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. **Muestras líquidas:**

6.1.1. La muestra debe ser colectada en frascos de 250 mL de vidrio (de preferencia), o de polipropileno. El frasco debe llenarse sin dejar cámara de aire, para mantener los materiales volátiles presentes en la solución. Debe estar debidamente etiquetado, e ingresar al laboratorio acompañado de la ficha de ingreso con los datos que se indican en la misma. Se debe mantener en oscuridad y bajo condiciones de refrigeración (entre 2-8 °C).

6.1.2. Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.

6.1.3. Es recomendable analizar la muestra lo antes posible, preferentemente dentro de las 24 horas. De ser necesario puede conservarse por un período máximo de 72 horas, bajo refrigeración y en oscuridad.

6.2. **Lixiviados**

6.2.1. El lixiviado debe obtenerse a partir de residuos sólidos según el procedimiento 6201UY, y mantenerse en oscuridad y bajo condiciones de refrigeración. El plazo para la realización del lixiviado es de 2 meses. Una vez obtenido la sustancia resultante del test de lixiviación, analizar dentro de las 72 horas.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Fotómetro Microtox Modelo 500 (comercializado por Modern Water), con el respectivo software (MicrotoxOmniTM Software for Windows versión 1,15 95/98/NT o equivalente).

7.2. Freezer a -20 °C.

7.3. Heladera.

7.4. Analizador de pH (Thermo Scientific Orion Star Versa o similar).

7.5. Cubetas cilíndricas de 12 x 50 mm, de vidrio borosilicato, descartables, de fondo plano comercializadas por Modern Water.

7.6. Micropipetas de 10 µL, y ajustables en el rango 200 – 1000 µL, con sus correspondientes punteros descartables.

7.7. Balanzas de resolución 0,0001 g y 0,001 g.

7.8. Timer.

7.9. Desionizador de agua (Millipore Elix Essential o similar), para obtener agua de calidad desionizada de conductividad menor a 1 µS/cm.

7.10. Centrífuga (para trabajar en el rango de 4.000 r/min).

7.11. Cubeta de corrección de color (CCC), reutilizable.

7.12. Pipeta Pasteur de vidrio punta fina para protocolo de corrección del color.

8. REACTIVOS

8.1. Viales liofilizados de la bacteria Aliivibrio fischeri (NRRL B-11177) comercializada por Modern water, y almacenados a –20 °C (reactivo bacteriano) hasta su fecha de vencimiento.

8.2. Agua ultrapura estéril (almacenable hasta por 2 meses en condiciones de refrigeración) o la solución de reconstitución comercializada por Modern Water (almacenable hasta por 1 año en condiciones de refrigeración).

8.3. Cloruro de sodio (NaCl Nro. CAS 7647-14-5) sólido.

8.4. Diluyente: solución de NaCl 2 % (p/v) en agua desionizada. Agregar 2 g de NaCl a 100 mL de agua desionizada. Puede almacenarse hasta por un año en condiciones de refrigeración.

8.5. Solución de ajuste osmótico (OAS): solución de NaCl 22 % (p/v) en agua desionizada. Agregar 22 g de NaCl a 100 mL de agua desionizada. Puede almacenarse hasta por un año en condiciones de refrigeración.

8.6. Tóxicos de referencia: fenol cristalino (C_6H_5OH Nro. CAS 108-95-2) o (opcional) sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$ Nro. CAS 74-46-20-0).

Para preparar las soluciones stock (100 mg/L) de los tóxicos de referencia, se pesan 50 mg de la sustancia química y se colocan en un matraz aforado. Enrasar a 500 mL con diluyente (NaCl 2 %). Se mezcla el contenido invirtiendo el recipiente al menos 10 veces. El estándar de fenol puede conservarse en frasco color ámbar y en condiciones de refrigeración durante 4 meses. El estándar de zinc puede almacenarse en iguales condiciones por 3 meses.

8.7. Soluciones para ajuste de pH.

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2) 1 N: disolver 40 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua desionizada y diluir a 1 L.
- Solución de ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0), 1 N: diluir 83 mL de HCl comercial (37 %, 12 N) con agua desionizada para obtener 1 L de solución.

8.8. Soluciones para muestras cloradas.

- Solución de sulfito de sodio (Na_2SO_3 Nro. CAS 7757-83-7) 0,025 N: disolver 0,1575 g de Na_2SO_3 en 100 mL de agua destilada. Esta solución no es estable. Prepararla en forma diaria.
- Solución de yoduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0): disolver 10 g de KI en 100 mL de agua desionizada.
- Solución indicadora de almidón: 5 g de almidón soluble $[(8C_6H_{10}O_5)n$ Nro. CAS 9005-25-8) en 1 L de agua desionizada. Calentar para disolver. Prepararla en forma diaria.
- Solución de ácido acético ($C_2H_4O_2$ Nro. CAS 64-19-7) 1+1, o de ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7667-93-9) 1+50 (1 mL de ácido en 50 mL de agua desionizada).

8.9. Agua desionizada (según ES 01).

Nota 1: Dejar registro de la preparación de reactivos en el RPR 15.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No es aconsejable reutilizar las cubetas de vidrio. Trazas de detergentes u otros contaminantes pueden interferir con el resultado del test.

9.2. Se aconseja realizar el test dentro de las 2 horas después de haber reconstituido el vial de bacterias. Dentro de este tiempo el organismo responde de forma consistente a un amplio espectro de tóxicos. Pasado dicho tiempo, la respuesta de las bacterias puede verse modificada. Si se utiliza el reactivo luego de las 2 horas de su reconstitución, se aconseja chequear la respuesta de las bacterias corriendo un test básico con un estándar de referencia como el fenol. La IC_{50} debe situarse dentro del rango correspondiente.

9.3. Se debe tener especial precaución en el modo de pipetear, ya que esto condiciona los resultados obtenidos. Para ello, asegurarse de homogeneizar bien la muestra antes de realizar la toma y luego dispensar totalmente el volumen adquirido.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Análisis de la muestra

11.1. Encender el aire acondicionado de la sala donde se encuentra el equipo Microtox para mantener temperatura ambiente cercana a 20 °C (el rango aceptable es: 15-30 °C).

11.2. Conectar el fotómetro a una fuente de corriente. El display muestra una luz roja que luego de estabilizada la temperatura (aproximadamente en 15 minutos) se apaga y prende una luz verde. En ese momento el equipo está listo para usar.

11.3. Se enciende el PC y se ingresa al software MicrotoxOmni, indicando el nombre de usuario y el password ("MANAGER"). Se elige la opción "Run a test" y el protocolo de ensayo deseado (por ejemplo "Basic Test"). Allí se completan los siguientes parámetros según se desee: número de controles, número de réplicas de los controles, número de muestras, número de réplicas por muestra, número de diluciones por muestra. El resto de los parámetros quedan establecidos automáticamente. Por ejemplo, para el caso del test Básico:

Inicial Concentration: 45,5.

Dilution Factor: 2.

Concentration Units: %.

Test Times: 5 y 15.

Time Units: min.

Zero Time Reading: Click.

Reading Method: Click Instrument.

11.4. La disposición de los pocillos en el fotómetro es la siguiente: cuenta con 5 columnas (denominadas del 1 al 5) y 6 filas (denominadas de la A a la F). Además, hay un pocillo a la derecha que es para el reactivo bacteriano y otro debajo que es para realizar la medición.

1	2	3	4	5	
O	O	O	O	O	A
O	O	O	O	O	B
O	O	O	O	O	C
O	O	O	O	O	D
O	O	O	O	O	E
O	O	O	O	O	F

A continuación se detalla el procedimiento para analizar una muestra empleando el test básico (cabe mencionar que el software despliega una guía de procedimiento para cada test que se quiera llevar a cabo):

11.5. Colocar cubetas limpias en los pocillos desde A1 a B5. Colocar una cubeta en el pocillo para reactivo bacteriano (termostatizado a 5,5 °C ± 1 °C) con 1000 µL del agua ultrapura o de la solución de reconstitución.

11.6. Colocar 500 µL de diluyente en las cubetas B1 a B5. Colocar 1000 µL de diluyente en las cubetas A1 a A4.

11.7. Colocar 2500 µL de la muestra en la cubeta A5 y agregar 250 µL de OAS. Mezclar aspirando y descargando con la pipeta. Descartar 750 µL.

11.8. Preparar diluciones seriadas 1:2 de la muestra haciendo transferencias de 1000 µL desde A5 a A4, desde A4 a A3, y desde A3 a A2. Mezclar con pipeta antes de cada transferencia. Descartar 1000 µL de la cubeta A2. De esta forma, las concentraciones de la muestra en cada una de las cubetas de la fila A es la siguiente: A5 (100 %), A4 (50 %), A3 (25 %) y A2 (12,5 %). En la cubeta A1 solo encontramos el diluyente.

11.9. Esperar 5 minutos para que todas las soluciones alcancen los 15 °C ± 1.0 °C.

11.10. Reconstituir un vial de reactivo bacteriano: tomar un vial del freezer a -20 °C con la menor manipulación posible de manera de evitar el calentamiento de las bacterias liofilizadas. Quitar el tapón con una pinza y verter rápidamente en él los 1000 µL del agua ultrapura o de la solución reconstituyente pre-enfriada, para suspender las bacterias. Tapar el vial y agitarlo suavemente 3 o 4 veces de manera de homogeneizar la suspensión. Inmediatamente transferir la suspensión a la cubeta de reconstituyente. Si la adición es lenta, puede ocurrir la lisis de la bacteria. Mezclar con pipeta de 500 µL aspirando y expulsando muy lentamente sin generar burbujas no menos de 20 veces para asegurar una dispersión uniforme del reactivo.

11.11. Inmediatamente, transferir 10 µL de reactivo a las cubetas B1 a B5, apoyando el puntero de la pipeta sobre la pared interna de la cubeta, y sin tocar la solución. Agitar suavemente las cubetas para asegurar que el reactivo entre en contacto con la solución.

11.12. Esperar 15 minutos para lograr el desarrollo de luminiscencia y que la producción de luz llegue a un estado estable.

11.13. Transcurrido ese tiempo, se realizan las lecturas a tiempo cero: colocar la cubeta B1 en el pocillo de lectura, presionar el botón SET del fotómetro para setear el instrumento, y luego proceder con las lecturas del resto de las cubetas según lo va indicando el programa, presionando cada vez el botón READ en el instrumento. Con esto se obtienen las medidas de luminosidad a tiempo cero (I0).

11.14. Inmediatamente transferir 500 µL de solución desde A1 a B1, A2 a B2, A3 a B3, A4 a B4, y A5 a B5. De esta forma, la concentración de la muestra en cada una de las cubetas de la fila B es: B5 (45,50 %), B4 (22,75 %), B3 (11,38 %), B2 (5,68 %), y B1 conteniendo solamente diluyente.

11.15. Cuando el monitor lo indique, realizar las lecturas para tiempo 5 minutos y 15 minutos.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Los datos de luminiscencia obtenidos son utilizados por el software para calcular el punto final del bioensayo: la concentración de la muestra que causa 50 % de inhibición de la luz emitida por la bacteria Aliivibrio fischeri (IC_{50}). Se mide la IC_{50} para 5 y 15 min (en los casos en que se desee se puede continuar la lectura a 30 min, modificando dicho parámetro antes de comenzar el test). En general la IC_{50} se determina para 15 minutos: IC_{50} (15 min). También indica el rango de confianza al 95 % para dicho valor. Cuanto más estrecho sea el rango de confianza, más precisos son los resultados.

12.2. La información desplegada en el monitor incluye: las concentraciones analizadas, las lecturas a tiempo 0 (I0) y tiempo t (It), o sea 5 y 15 min, y el cálculo del parámetro "Gamma" para cada concentración y tiempo de exposición, que es el cociente entre la luz perdida y la luz remanente luego de que se expuso el reactivo a la muestra. Gamma es calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{Gamma} = \frac{(R5 \times I_0) - I_t}{I_t}$$

donde, R5 es la razón del blanco (luz emitida en la cubeta del blanco a tiempo t con respecto a la luz emitida a tiempo cero), que corrige por la pérdida natural de luz que se produce con el paso del tiempo en la cubeta del blanco (conteniendo solamente diluyente y reactivo).

$$R5 = \frac{\text{Control } I_t}{\text{Control } I_0}$$

También se muestra el porcentaje de efecto (o porcentaje de pérdida de luz) de cada concentración de la muestra, comparado con el blanco.

12.3. El valor de IC_{50} y el intervalo de confianza al 95 % aparece al pie del reporte. Se calcula a partir de la serie de concentraciones testeadas y por definición IC_{50} = Gamma 1 (cuando el valor de Gamma se iguala a la unidad, la luz perdida es igual a la luz remanente, lo que equivale a decir que la mitad de la luz producida por las bacterias se ha perdido por exposición a la muestra).

12.4. Se incluye en el reporte otro gráfico además del anteriormente mencionado: "porcentaje de efecto vs. concentración", señalándose la línea utilizada para el cálculo de IC_{50}.

12.5. Expresar los resultados como IC_{50}, 15 min. También se puede convertir el resultado a unidades de toxicidad (UT), siendo UT= 100/IC_{50}. En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de la muestra según la IC_{50} y la correspondiente unidad de toxicidad:

IC_{50}	UT	CLASIFICACIÓN
< 25 %	> 4	Muy tóxica
25 a 50 %	2 a 4	Tóxica
51 a 75 %	1,33 a 1,99	Moderadamente tóxica
76 a 99 %	1,01 a 1,32	Levemente tóxica
≥ 100 %	≤1,00	No Tóxica

Fuente: Qureshi 1990, p3-89. Microbiology methods manual. Alberta Environmental Centre.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de exactitud con el tóxico de referencia:** Como forma de asegurar la validez de los resultados analíticos, cada vez que se reconstituye un vial de reactivo bacteriano, se debe ejecutar el protocolo del Test Básico empleando una solución de 100 mg/L de fenol como tóxico de referencia. La IC_{50} (5 min) de la solución de fenol debe presentar un porcentaje de recuperación entre 70 % y 130 % respecto al valor de referencia. Registrar los resultados obtenidos en el gráfico de control correspondiente, indicando los límites inferior y superior según dicho rango de recuperación.

13.2. **Control de la precisión:** Analizar una muestra por duplicado por día de análisis. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites del gráfico de control de rangos normalizados correspondiente. Si las muestras de la corrida dan todas >100 %, entonces se corre por duplicado el fenol o una muestra que presente toxicidad (que se tenga de veces anteriores) de manera de siempre tener un valor de precisión con cada corrida.

13.3. El valor de R^2 (coeficiente de correlación) obtenido de la curva concentración vs. respuesta debe ser mayor o igual a 95 % (0,95).

13.4. Cálculo de IC_{50} a partir de datos extrapolados. El valor de IC_{50} se determina por interpolación cuando Gamma vale 1 a partir del gráfico de log (Gamma) vs. log (concentración). Es deseable que cuando la muestra presenta toxicidad, en el test se obtenga al menos una concentración que cause más del 50 % de reducción de luz y otra que cause menos del 50 % de reducción de la luminosidad. De no ser así repetir el test con un rango de concentraciones más adecuadas. Informar el valor de IC_{50} a partir de datos extrapolados, solamente si el rango de confianza al 95 % que aparece al pie del reporte, se sitúa dentro de una misma categoría de clasificación de toxicidad (ver cuadro del punto 11.5). De lo contrario repetir el análisis, e informar el valor solamente si el rango normalizado de los duplicados se encuentra dentro de los límites de control previamente establecidos.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. ENVIRONMENT CANADA. Biological test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (Photobacterium phosphoreum). Report EPS 1/RM/24. November 1992. pp 1-61.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Método 8050 Bacterial bioluminescence. pp. 901-904.

14.3. AZUR ENVIRONMENTAL. MicrotoxOmniTM Software for Windows® 95/98/NT. User Manual. Julio 1999. pp 1-31.

14.4. Microtox® M500 Analyser. User manual. Modern Water.

14.5. Microtox Manual. A Toxicity Testing Handbook. 1992. Vol IV: Data quality applying results. pp 405-443. Microbics Corporation.

14.6. Qureshi, A. A. Microbiology Methods Manual. Vegreville, Alberta: Alberta Environmental Centre; 1990. Pp: 3-89.

6161UY

Evaluación de la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales líquidas mediante la inhibición del crecimiento de *Lemna spp.* (macrófita de agua dulce)

Elaborado - G. Pistone

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para evaluar la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales como son las aguas residuales domésticas e industriales y lixiviados de residuos sólidos. Este es un bioensayo normalizado, que emplea como organismo indicador a *Lemna spp*, planta de agua dulce, perteneciente a la familia de las Lemnaceas comúnmente llamada lenteja de agua. Al ser una planta flotante puede ser utilizada sin inconvenientes en aguas coloreadas o turbias sin necesidad de ser filtradas previamente, lo que podría alterar su integridad.

1.2. Este bioensayo resulta de suma utilidad para determinar la fitotoxicidad de sustancias que suelen concentrarse en la interfase agua-aire, como lo son las sustancias tenso-activas, aceites y grasas, compuestos tóxicos orgánicos. También este test es útil para determinar la toxicidad de compuestos metálicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas y productos farmacéuticos. Al presentar un nivel de complejidad superior al de las algas, la lenteja de agua tiene un patrón de sensibilidad más representativo del de las plantas vasculares.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: “Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad” (6201UY).

2.6. Instructivo de uso de equipo bomba de vacío (INE 02).

2.7. Instructivos de uso de equipo autoclaves verticales (INE 155).

2.8. Instructivo de uso de equipo balanza (INE 16A e INE 16B).

2.9. Instructivo de uso equipo cámara de flujo laminar (INE 17).

2.10. Instructivo de equipo desionizador Millipore Elix Essentials (INE 121).

2.11. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98).

2.12. Instructivo de uso incubadora con control de iluminación (INE 116).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

2.14. Rutas de análisis (RET 05).

2.15. Registro de preparación de reactivos: RPR18.

2.16. Registro de preparación de soluciones control: RPS17.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Es un bioensayo estandarizado a nivel internacional, que emplea como organismo a testear *Lemna spp*., planta vascular pequeña, de libre flotación, que habita aguas tranquilas dulces (estanques, lagos, arroyos) y estuarinas, cosmopolita en zonas tropicales y templadas. Las frondas de *Lemna* se presentan solas o en pequeños racimos (3 a 5), son elípticas a redondeadas, de 2 a 4 mm de largo, de color verde, y tienen una sola raíz que emana desde el centro de la superficie inferior. La reproducción de *Lemna spp.* generalmente es vegetativa (asexuada) por ramificación lateral, y es rápida en comparación con otras plantas vasculares. La reproducción sexual (a través de flores) raramente ocurre en la naturaleza.

3.2. En el bioensayo, para una mayor estandarización, se parte de un cultivo crecido a partir de una sola planta aislada. Las plantas deben ser cultivadas en el laboratorio durante un mínimo de 8 semanas antes de ser utilizadas. Para el test se utilizan plantas jóvenes, extraídas de dicho cultivo, de entre 7-10 días de edad y sin lesiones visibles.

3.3. En el ensayo, las plantas se cultivan durante 7 días a una temperatura de 25 ± 2 °C, con iluminación continua, fluorescente, con una tasa de radiación sobre la superficie del cultivo entre 4.200-6.700 lux. Al final de los 7 días de incubación se determina el efecto adverso de la muestra, evaluado a través de la inhibición del crecimiento (reducción en el número de frondas respecto al control). El ensayo está diseñado para determinar la cantidad de muestra de ensayo, que produce un 50 % de inhibición en el crecimiento respecto al control (IC_{50}). Ver Anexo I.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El analista debe utilizar equipo de seguridad apropiado (guantes descartables y túnica) de acuerdo a la naturaleza de la muestra bajo estudio.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No presenta interferencia por turbidez o muestras coloreadas. No se recomienda filtrar la muestra a menos que se observe presencia de algas. Solamente en este caso filtrar a través de filtro de fibra de vidrio, tamaño de poro aproximado de 1 µm, para reducir el riesgo de que se produzca contaminación algal durante el test.

5.2. No es necesario ajustar el pH de la muestra si se encuentra dentro del rango de 6,0 - 9,5. En estos casos, el ensayo debe realizarse sin modificaciones para evaluar el efecto tóxico total.

Si el pH de las diluciones analizadas está fuera de ese rango, se recomienda realizar un ensayo adicional ajustando el pH a un valor entre 7,0 y 7,5, de forma simultánea al test original, con el fin de determinar la toxicidad de la muestra sin la influencia del pH. En estas situaciones, la condición del ajuste de pH deberá registrarse en el informe de resultados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. **Muestras líquidas:** La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio, o de polipropileno de 2 L de capacidad (o en su defecto 2 recipientes de 1 L). El frasco debe llenarse sin dejar cámara de aire, para mantener los materiales volátiles presentes en la solución. Se debe mantener en oscuridad y bajo refrigeración. Es recomendable analizar la muestra lo antes posible. De ser necesario puede conservarse por un período máximo de 3 días, bajo refrigeración y en oscuridad.

6.2. **Lixiviados:** El lixiviado debe obtenerse a partir de residuos sólidos según el SOP 6201UY, y mantenerse en oscuridad y en condiciones de refrigeración (2-8 ˚C). El plazo para la realización del lixiviado es de 2 meses. Una vez obtenido la sustancia resultante del test de lixiviación, analizar dentro de los 3 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1 Incubadora a 25 ± 2 °C, equipada con luz continua fluorescente blanca-fría (4.200-6.700 lux).

7.2 pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).

7.3 Desionizador de agua (Millipore Elix Essential o similar).

7.4 Heladera a 2-8 ˚C.

7.5 Autoclave para esterilización.

7.6 Cámara de flujo laminar (opcionalmente se puede trabajar entre 2 mecheros).

7.7 Balanzas de resolución 0,01 g.

7.8 Lupa u otro equipo de magnificación.

7.9 Equipo de filtración compuesto por: bomba de vacío, embudo Büchner con porta filtro de 47 mm de diámetro y kitasato de 1000 mL.

7.10 Filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, tamaño de poro aproximado de 1um, y filtro de membrana de 0,22 µm tamaño de poro.

7.11 Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.

7.12 Recipientes plásticos descartables de al menos 100 mL de capacidad, boca ancha, transparentes con tapa.

7.13 Matraz aforado de 1 L.

7.14 Erlenmeyer de vidrio de 250, 500, 1000 mL de capacidad.

7.15 Probetas de vidrio graduadas de 50 y 100 mL de capacidad.

7.16 Pipetas automáticas de 1000 µL y de rango variable (1-10 mL), y punteros estériles para cada una de las pipetas automáticas.

7.17 Tiras de papel indicador de pH.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Tóxicos de referencia: solución de cloruro de potasio (KCl), 100 g/L.

Para preparar la solución stock del tóxico de referencia, se pesan 100 g de la sustancia química y se lleva a 1.000 mL con agua desionizada. Agitar hasta disolver completamente. El estándar de cloruro de potasio puede conservarse en frasco color ámbar y en condiciones de refrigeración durante 6 meses.

8.3. Soluciones para ajuste de pH.

- Solución NaOH 1 N: disolver 40 g NaOH en agua desionizada y diluir a 1 L.
- Solución NaOH 6 N: disolver 24 g de NaOH en agua desionizada y diluir a 0,1 L.
- Solución HCl 1 N: diluir 83 mL de HCl comercial (37 %, 12 N) con agua desionizada para obtener 1 L de solución.
- Solución HCl 6 N: diluir 50mL de HCl comercial con agua desionizada para obtener 0,1 L de solución.

8.4. Medio de cultivo y medio de dilución: Medio Bold comercial (Sigma B5282)

- diluir 20 mL de medio Bold comercial con agua desionizada para obtener 1 L de solución. Ajustar el pH a 7,5 ± 0,1 con NaOH o HCl. Esterilizar el medio filtrándolo a través de un filtro de membrana de 0,22 um de tamaño de poro. De preferencia prepararlo en forma diaria. De lo contrario almacenarlo en condiciones de refrigeración y en oscuridad hasta por 1 mes (antes de su uso chequear el pH). Dejar registro de la preparación de reactivos en el RPR18.

8.5. Soluciones de ph 4, 7 y 10 para ajuste del phmetro.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Utilizar guantes y túnica para el tratamiento de las muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas:

11.1. **Mantenimiento de cultivos stock de *Lemna*:** Los cultivos stock pueden mantenerse en Erlenmeyers de 1.000, 500 o 250 mL (conteniendo respectivamente 400, 200 y 100 mL de medio de cultivo). Semanalmente transferir asépticamente una planta de *Lemna* a cada recipiente conteniendo el medio de cultivo fresco e incubar durante 7-12 días bajo las condiciones del ensayo: 25 ± 2 ºC y con luz fluorescente blanca-fría continua (4.200-6.700 lux).

Las plantas deben ser cultivadas en laboratorio por al menos 8 semanas antes de ser utilizadas en los test de ecotoxicidad.

Para reducir la frecuencia de mantenimiento cuando no se planea realizar test de toxicidad por un período prolongado, las plantas pueden ser mantenidas bajo una luminosidad reducida y a bajas temperaturas (4-10 °C), una vez transcurridos los 7-12 días de incubación inicial a 25 ± 2 ºC. En estas condiciones, los sub-cultivos pueden realizarse con menos frecuencia (se considera aceptable espaciarlos hasta 3 meses).

Como alternativa para un mantenimiento a largo plazo o para contar con un cultivo de respaldo, puede emplearse medio de cultivo solidificado con agar al 1%. Para ello, preparar y autoclavar el medio en Erlenmeyer con tapón de algodón. Agregar 2 o 3 plantas de forma aséptica una vez que el agar se ha enfriado. Cubrir el tapón de algodón con papel de aluminio para minimizar la evaporación y almacenar en lugar frío y con poca luz, por 6 meses.

La presencia de turbidez en el cultivo, indica contaminación bacteriana. La contaminación con hongos no es evidente hasta que aparecen grandes colonias en el medio, o se desarrolla una capa de limo en el recipiente. Los cultivos contaminados con algas, protozoarios, hongos o bacterias deben ser desechados (ver Anexo II).

11.2. **Preparación de los cultivos a utilizar en los test de ecotoxicidad:** Los cultivos destinados a los ensayos de ecotoxicidad deben ser iniciados entre 7-12 días antes del comienzo del test. Transferir asépticamente una cantidad adecuado de plantas provenientes de un cultivo semanal a un Erlenmeyer conteniendo el medio de cultivo estéril e incubar bajo las condiciones del test.

Es importante evitar la superpoblación al final del período de incubación (7–12 días); las plantas no deben cubrir más de dos tercios de la superficie del medio. Se deben comenzar múltiples sub cultivos de *Lemna*, para garantizar la disponibilidad de al menos un cultivo estéril en caso de que alguno se contamine.

Análisis de la muestra (Test de Ecotoxicidad)

11.3. Para los test de ectoxicidad se selecciona una cantidad suficiente de plantas de 7-12 días de edad, provenientes de cultivos no superpoblados y aclimatados en el medio de cultivo. Se deben elegir plantas que presenten un color verde brillante y sin áreas decoloradas.

11.4. La muestra, así como el medio de cultivo utilizado para preparar las diluciones del test y los controles, deben aclimatarse a temperatura ambiente antes de comenzar el test.

11.5. Para que la muestra se encuentre enriquecida en nutrientes, agregar 20 mL de medio Bold comercial a 1 L de la muestra (por lo tanto, la máxima concentración que se puede testear de la muestra es de 98 %). Medir el pH de la muestra. No es necesario ajustarlo si se encuentra en el rango de 6,0-9,5, en las diluciones a ser utilizadas en el test. De ser necesario ajustar el pH a 7,0-7,5 con NaOH o HCl.

11.6. Realizar diluciones seriadas de la muestra; generalmente se utiliza un factor de dilución de 0,5 (ejemplo: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %). No se aconseja realizar diluciones con un factor menor o igual a 0.3 (ejemplo: 100 %, 30 %, 9 %, 2,7 %, 0,8 %), ya que lleva a resultados pocos precisos. Testear al menos 5 concentraciones diferentes además del control negativo (conteniendo solamente medio de cultivo). Realizar 4 réplicas por tratamiento. Las diluciones se pueden preparar directamente en los recipientes del test o en frascos volumétricos independientes. Primero pipetear el volumen apropiado del medio de cultivo. Luego se agrega la muestra enriquecida con los nutrientes. Se homogeniza la mezcla para alcanzar las concentraciones deseadas. Cada recipiente del test debe contener 100 mL de solución.

11.7. Colocar en cada recipiente del test 6 frondas de *Lemna spp.* utilizando un ansa de inoculación u otro elemento estéril que sirva para dicho fin. Las plantas se sumergen ligeramente en la solución del test (comenzar con la concentración más baja, de manera de no contaminar con solución del test las distintas concentraciones). Procurar que las plantas no queden adheridas a la pared del recipiente y que las raíces queden sumergidas. La transferencia debe hacerse en un área limpia, sin corrientes de aire y lo más rápidamente posible, para minimizar la contaminación bacteriana. Registrar el número de frondas en cada recipiente. El espacio y la disponibilidad de nutrientes no pueden ser factores limitantes del crecimiento, por lo que los recipientes de test no pueden estar superpoblados al final de los 7 días de incubación.

11.8. Colocar los recipientes con las distintas diluciones y sus réplicas, distribuidos aleatoriamente, en la incubadora. Deben cubrirse con una tapa para evitar perdida de posibles sustancias volátiles y evitar contaminación ambiental. Incubar a 25 ± 2 °C, con iluminación fluorescente blanca-fría continua, entre 4.200- 6.700 lux, durante 7 días.

11.9. El pH debe medirse con tiras reactivas al inicio del ensayo (antes de incorporar las plantas a los recipientes) y al finalizar, en al menos tres concentraciones: la más baja, la intermedia y la más alta.

11.10. Al día 7 contar y registrar el número de frondas en cada recipiente del test (sin importar el tamaño de las mismas, siempre y cuando sean visibles adyacentemente a la fronda parental, cualquier pequeño brote se considera una fronda). Dejar registrado también si existe clorosis (perdida de pigmento), necrosis (muerte localizada de tejido que aparece como marrón o blanca), tamaño anormal de frondas, gibosidad (joroba o apariencia hinchada), destrucción de colonias (frondas solas), destrucción de raíces y perdida de flotación.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. A partir del número de frondas, se realiza el cálculo del **Rendimiento (R)**, restando el número inicial de frondas (generalmente 6), al número de frondas obtenido a los 7 días de incubación.

$$R = nf - ni$$

donde:

nf: número de frondas a los 7 días de incubación.

ni: número de frondas al inicio del test.

Los datos de Rendimiento se ingresan a un programa estadístico (por ejemplo, ICPin) que calcula la IC_{50} a través de un análisis de regresión de la curva concentración vs. respuesta.

12.2. También se puede calcular el Porcentaje de inhibición (%I) respecto al control para cada tratamiento. Se calcula de la siguiente manera:

$$\% I = [(C-X) \times 100] / C$$

donde:

C: Rendimiento (R) promedio del control.

X: Rendimiento promedio de cada tratamiento. (Si ocurre estimulación del crecimiento en vez de inhibición se reporta como % I negativo).

12.3. El resultado final se expresa como IC_{50} (7 días): concentración de la muestra que produce una inhibición del crecimiento en un 50 % respecto al control, medido a través de la reducción del número de frondas. También se puede convertir el resultado a unidades de toxicidad (UT), siendo UT= $100/IC_{50}$. En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de la muestra según su IC50 y la correspondiente unidad de toxicidad:

IC_{50}	UT	CLASIFICACIÓN
< 25%	> 4	Muy tóxica
25 a 50%	2 a 4	Tóxica
51 a 75%	1,33 a 1,99	Moderadamente tóxica
76 a 99%	1,01 a 1.32	Levemente tóxica
≥100%	≤1.00	No Tóxica

Fuente: Qureshi 1990, p.3-89. Microbiology methods manual. Alberta Environmental Centre.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control negativo (blanco):** consiste en incubar recipientes con igual cantidad de plantas, mismo medio de cultivo y mismas condiciones de incubación que las muestras.

El test es válido si el número promedio de frondas en el control negativo al día 7 se incrementa por un factor igual o mayor a 7, respecto al inicio del test, lo que corresponde a una tasa de crecimiento relativa (T) igual o mayor a 0.275 / día.

$$T = [\ Ln(nf) - Ln(ni)\ ] / t$$

donde:

nf: número de frondas a los 7 días de incubación.

ni: número de frondas al inicio del test.

t: período de tiempo (7 días).

A su vez, el coeficiente de variación (CV) del Rendimiento (punto 12.1) en el control, al final del test debe ser menor a 30 %.

13.2. **Control de exactitud con el tóxico de referencia:** Como forma de asegurar la validez de los resultados analíticos, mensualmente se debe realizar un test con el tóxico de referencia (KCl). Registrar los resultados obtenidos en el gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de precisión:** Cada vez que se analizan muestras, se deben realizar 4 réplicas por tratamiento. Al finalizar los 7 días de incubación, el coeficiente de variación (CV) del rendimiento (ver punto 12.1) para cada tratamiento debe ser menor al 30 %, en recuentos promedios mayores a 10 frondas.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1 EPA. Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.4400: Aquatic Plant Toxicity test using Lemna spp. Enero 2012.pp: 1-22.

14.2. ENVIRONMENT CANADA. Biological test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, Lemna minor. Report EPS 1/RM/37. Enero 2007.

14.3. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Sección 8211, Duckweed. pp: 931-935.

14.4 Qureshi, A. A. Microbiology Methods Manual. Vegreville, Alberta: Alberta Environmental Centre; 1990. Pp: 3-89.

Anexo 1: Condiciones generales del test

Tipo de test	Estático.
Duración del test	7 días.
Temperatura	25 ± 2 °C.
Iluminación	Continua, fluorescente blanca-fría, entre 4.200- 6.700 lux.
Recipiente de test	Recipientes de plástico descartables. Se recomienda una profundidad de 4 cm de solución del test, y un volumen mínimo de 100 mL. Colocados sobre superficie oscura no refractante.
Medio de cultivo y medio de dilución	Medio Bold comercial (medio utilizado tanto para el mantenimiento de *Lemna* como para los test de ecotoxicidad).
Organismos del test	2 -3 plantas de *Lemna* de entre 7-10 días de edad provenientes de cultivos saludables (6 frondas en total por recipiente).
Nº de concentraciones	Mínimo 5, más el control negativo.
Nº réplicas	Mínimo 4 réplicas por tratamiento.
Filtración	No se requiere para muestras de efluentes, a menos que se vea presencia de algas. En este caso, filtrar a través de filtro de fibra de vidrio, tamaño de poro 1 um.
pH	No se requiere ajuste si el pH de la muestra se encuentra entre 6,5-9,5 en las diluciones del test. Se debe medir al comienzo y al final del test, en algunas concentraciones.
Punto final	IC_{50} = concentración de la muestra que produce una inhibición del crecimiento en un 50% respecto al control, medido a través de la reducción del número de frondas.
Tóxico de referencia	Cloruro de potasio (KCl).
Validez del test	El número de frondas en el control negativo al finalizar los 7 días de incubación debe ser 7 veces mayor que al inicio del test. El Coeficiente de variación (CV) en el control debe ser ≤ 30%.

Anexo 2: Obtención de cultivos axénicos

Los cultivos axénicos están libres de cualquier tipo de contaminante. Una buena técnica de manipulación y el uso adecuado de una campana de flujo laminar son esenciales para mantener cultivos axénicos de *Lemna*.

Las zonas de cultivo tales como mesadas, donde se encuentren los cultivos estériles deben ser periódicamente limpiadas con hipoclorito de sodio al 1 % (en un matraz aforado se agrega 100 mL de hipoclorito comercial que generalmente es al 5 %, y se completa con agua desionizada hasta un volumen de 500 mL) para mantener bajos los niveles de ácaros del polvo, bacterias y esporas de hongos. La solución de cloro debe prepararse cada vez y debe permanecer en las superficies al menos 20-30 minutos.

Si de todas formas las plantas de *Lemna* se contaminan, se pueden lograr nuevamente cultivos axénicos, pero las técnicas requieren tiempo y paciencia. Con el fin de hacer esto, las plantas conectadas en agrupaciones clónicas deben separarse entre sí. Las plantas individuales deben ser sumergidas en una solución de 0,5% de hipoclorito de sodio durante al menos un minuto (tratar con diferentes tiempos para asegurar que se obtenga al menos un cultivo vivo estéril). Asegúrese de enjuagar las plantas con agua estéril antes de transferirlas al medio de crecimiento. Las plantas correctamente esterilizadas tendrán una pequeña zona verde en la zona del brote a lo largo del centro de la fronda. Si no hay brote verde restante, se trató la planta demasiado tiempo y está muerta.

Luego de su desinfección, incubar las plantas a 25 ± 2 °C, bajo luz continua, fluorescente blanca-fría, durante 7-10 días.

6163UY

Evaluación de la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales líquidas mediante la inhibición de la elongación de la radícula en semillas de *Lactuca sativa* (lechuga)

Elaborado - G. Pistone

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para evaluar la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales como son las aguas superficiales, aguas residuales domésticas e industriales y lixiviados de residuos sólidos. Este es un bioensayo normalizado, que emplea como organismo indicador semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), en los cuales se determina la inhibición en la elongación de la radícula, (fracción embrionaria que posteriormente dará lugar a la raíz primaria de la planta) o inhibición de la germinación. En especial resulta de interés la aplicación de este bioensayo para la evaluación de la ecotoxicidad aguda en aquellos residuos sólidos factibles de ser dispuestos a terreno como mejoradores de suelo.

1.2. Este bioensayo resulta de suma utilidad para determinar la fitotoxicidad de compuestos puros o de mezclas complejas, en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Durante estos períodos tempranos de desarrollo, en la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Cabe mencionar que muchos de los procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie es en gran medida representativa de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie.

1.3. La evaluación del efecto en la elongación de la radícula de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no llegan a inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la raíz. De esta manera, constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: “Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad” (6201UY).

2.6. Instructivo de uso de equipo balanza (INE 16A e INE 16B).

2.7. Instructivo de equipo desionizador Millipore Elix Essentials o similar (INE 121).

2.8. Instructivo de uso analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar o similar (INE 98).

2.9. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

2.10. Rutas de análisis (RET 07).

2.11. Registro de preparación de reactivos (RPR 21).

2.12. Registro de preparación de soluciones control (RPS 19).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Es un bioensayo estandarizado a nivel internacional, que emplea como organismo a testear semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a los márgenes de cuerpos de agua contaminados (actúa como estimador del daño en especies terrestres de la flora riparia), siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. La especie *Lactuca sativa* ha sido muy difundida para su aplicación en ensayos de ecotoxicidad, tanto por su sensibilidad a diferentes tipos de contaminantes (metales, plaguicidas y otros compuestos orgánicos), como su simplicidad en la ejecución del bioensayo.

3.2. En el ensayo, las semillas se dejan germinar durante 5 días a una temperatura de 25 ± 1 ºC, y bajo condiciones de oscuridad. Los recipientes de experimentación utilizados son placas de Petri de 100 x 15 mm con papel de filtro Whatman. Se agregan 4 mL de la muestra a ensayar por recipiente. Al término de los 5 días de incubación se determina el efecto adverso de la muestra, evaluado a través de la inhibición en la elongación de la radícula o inhibición de la germinación. El ensayo está diseñado para determinar la cantidad de muestra de ensayo que produce un 50 % de inhibición en el desarrollo respecto al control (IC_{50}). Ver Anexo I.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El analista debe utilizar equipo de seguridad apropiado (guantes descartables y túnica) de acuerdo a la naturaleza de la muestra bajo estudio.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No presenta interferencia por turbidez o muestras coloreadas, por lo que no es necesario filtrar la muestra previamente.

5.2. pH. Registrar el pH de la muestra en las diluciones a testear (en al menos 2 diluciones). Analizar sin ajuste de pH. Si el pH de las diluciones presentara valores extremos que pudieran afectar la supervivencia de las semillas, deberá evaluarse la pertinencia de realizar el bioensayo con ajuste de pH a valores cercanos a 7.0. En caso de aplicarse dicho ajuste, se deberá mencionar en el informe de resultados.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. **Muestras líquidas:** La muestra debe ser colectada en frascos de vidrio ámbar, o de polipropileno color marrón de 1 L de capacidad. El frasco debe llenarse sin dejar cámara de aire, para mantener los materiales volátiles presentes en la solución. Se debe mantener en oscuridad y bajo refrigeración. Es recomendable analizar la muestra lo antes posible. De ser necesario puede conservarse por un período máximo de 3 días, en condiciones de refrigeración (2-8 ˚C) y en oscuridad.

6.2. **Lixiviados:** El lixiviado debe obtenerse a partir de residuos sólidos según el SOP 6201UY, y mantenerse en oscuridad y en condiciones de refrigeración. El plazo para la realización del lixiviado es de 2 meses. Una vez obtenido la sustancia resultante del test de lixiviación, analizar dentro de los 3 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Incubadora a 25 ± 1 ºC (FQ 431).
7.2. Placa de Petri de 100 mm de diámetro plástico descartables o vidrio.
7.3. Regla u otro elemento de medición.
7.4. Pinzas de acero inoxidable para filtros, sin extremidades rugosas.
7.5. Bolsas plásticas.
7.6. Papel de filtro Whatman No. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro (sustrato de germinación).
7.7. pHmetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).
7.8. Desionizador de agua (Millipore Elix Essentials o similar).
7.9. Heladera a 2-8 ˚C.
7.10. Freezer (opcional).
7.11. Balanzas de resolución 0,001 g.
7.12. Balanza de resolución 0.0001 g.
7.13. Matraz aforado de 100 y 1000 mL.
7.14. Erlenmeyer de vidrio de 100 o 250 mL de capacidad para hacer las diluciones.
7.15. Probetas de vidrio graduadas de 50 y 100 mL de capacidad.
7.16. Pipetas automáticas de rango variable (1-10 mL), con sus respectivos punteros.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).
8.2. Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$).
8.3. Sulfato de magnesio ($MgSO_4$).
8.4. Cloruro de potasio (KCl).
8.5. Sulfato de calcio ($CaSO_4 \bullet 2H_2O$).
8.6. Tóxico de referencia: solución de sulfato de Zinc ($ZnSO_4$) de concentración 100 mg/L. Para preparar la solución stock del tóxico de referencia, se pesan 100 mg de la sustancia química y se lleva a 1000 mL con agua desionizada. Agitar hasta disolver completamente. El estándar de sulfato de zinc puede conservarse en frasco color ámbar y en condiciones de refrigeración durante 6 meses.
8.7. Agua dura Reconstituida (tabla 8010: I, ref. 14.3). Colocar 900 mL de agua desionizada en un matraz y adicionar 120 mg de $MgSO_4$, 192 mg de $NaHCO_3$ y 8.0 mg de KCl. Agitar hasta disolver completamente las sales. Paralelamente, disolver 120 mg de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ en 100 mL de agua desionizada. Es necesario tener en cuenta que la disolución de esta sal puede requerir un periodo de tiempo prolongado. Terminada la solubilización de la sal, incorporar la solución de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al matraz, lo cual permitirá obtener 1.000 mL de agua dura reconstituida.

Una vez terminada la preparación del agua reconstituida, se mide el pH, el cual deberá situarse entre 7.6 y 8.0. Mantener el agua de dilución en condiciones de refrigeración por un periodo de hasta seis meses. Agitar para airear antes de su uso.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Utilizar guantes y túnica para el tratamiento de las muestras.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Operaciones previas:

11.1. **Obtención de los organismos de prueba y verificación de la viabilidad de las semillas:** La obtención de las semillas de lechuga se realiza en semillerías comerciales, procurando dentro de lo posible que sean semillas sin curar (sin fungicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula. Para el caso de semillas que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. Obtener un número de semillas suficiente para realizar los ensayos durante 1 año.

Previo a la implementación de la prueba, es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 80 %, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula (coeficiente de variación <30 %). Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo igual o mayor al 80 % se debe aumentar el número de semillas por placa.

Las semillas seleccionadas se almacenan en condiciones de refrigeración, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante 2 años.

11.2. **Preparación de las diluciones de la muestra:** Realizar diluciones seriadas de la muestra con el agua dura reconstituída. Generalmente se utiliza un factor de dilución de 0.5 (ejemplo: 100 %, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %, 3.125 %). No se aconseja realizar diluciones con un factor menor o igual a 0.3 (ejemplo: 100 %, 30 %, 9 %, 2.7 %, 0.8 %), ya que lleva a resultados pocos precisos.

Testear al menos 5 concentraciones diferentes de la muestra, más el control negativo (conteniendo solamente agua de dilución). Realizar 3 réplicas por tratamiento.

Análisis de la muestra (Test de Ecotoxicidad)

11.3. Colocar en cada placa de Petri un disco de papel de filtro. Rotular correctamente cada placa con la dilución correspondiente.

11.4. Saturar el papel de filtro con 4 mL de la dilución correspondiente evitando que se formen bolsas de aire.

11.5. Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente al menos 10 semillas, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.

11.6. Tapar las cajas de petri y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las placas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocar las semillas en su interior y durante el periodo de ensayo. Colocar las placas de Petri dentro de la incubadora.

11.7. Incubar por 120 horas (5 días) a una temperatura de 25 ± 1 ºC. Colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación.

11.8. Terminado el periodo de exposición (120 horas), se procede a cuantificar el efecto en la germinación. Para ello, registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula con al menos 3 mm de longitud.

11.9. Observar y registrar el estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, desarrollo de hongos, etc.). La necrosis se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón.

11.10. Posteriormente, cuantificar el efecto en la elongación de la radícula. Para ello, utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula de cada una de las plántulas, correspondientes a cada dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular (Figura 1).

11.11. Un procedimiento que facilita la medición de la radícula consiste en congelar las placas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo. De esta manera las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo.



Figura 1: Esquema de plántula de *Lactuca sativa* al finalizar el periodo de exposición.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1 Con los datos recabados al finalizar el ensayo, se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio de la elongación de la radícula (cm) de las plántulas de cada réplica y para las diferentes concentraciones testeadas y el control.

  Con estos datos, se elabora la gráfica concentración vs. respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración de la muestra. Mediante el uso de programas estadísticos se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (IC_{50}) en la elongación de la radícula respecto al control.

- Si se vio afectada directamente y en gran parte la germinación de las semillas (semillas en las que no se observa crecimiento de la radícula), se puede calcular el porcentaje de inhibición (% I) en la germinación de cada tratamiento respecto al control de la siguiente manera:

$$\% I = [(C-X) \times 100] / C$$

Dónde:

C: Promedio de germinación del control negativo o blanco.

X: Promedio de cada tratamiento (dilución testeada de la muestra).

Con estos datos se puede también calcular la IC_{50}, pero en este caso el punto final será inhibición de la germinación respecto al control.

12.2 El resultado final se expresa como IC_{50} (5 días): concentración de la muestra que produce una inhibición del crecimiento en un 50 % respecto al control, medido a través de la elongación de la radícula (o en su defecto inhibición de la germinación).

También se puede convertir el resultado a unidades de toxicidad (UT), siendo UT= 100/IC_{50}. En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de la muestra según la IC_{50} y su correspondiente unidad de toxicidad:

IC_{50}	UT	CLASIFICACION
< 25%	> 4	Muy tóxica
25 a 50%	2 a 4	Tóxica
51 a 75%	1,33 a 1,99	Moderadamente tóxica
76 a 99%	1,01 a 1.32	Levemente tóxica
≥100%	≤1.00	No Tóxica

Fuente: Qureshi 1990, p3-89. Microbiology methods manual. Alberta Environmental Centre.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1 **Control negativo (blanco):** consiste en incubar las semillas en placas de Petri con agua de dilución, bajo iguales condiciones de incubación que el resto de las muestras.

El test es válido si el porcentaje de germinación en el control negativo es mayor o igual a 65 % y el coeficiente de variación (CV) en la variabilidad en la elongación de la radícula es menor o igual al 30 %. Las radículas deben tener una longitud de al menos 2 cm.

Se debe establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, determinando para cada lote de semillas el valor de IC_{50}. A tales efectos, se realizan cartas control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio y límites de control tomando en cuenta el promedio + 3SD de la elongación de la radícula).

La reducción en el poder germinativo (< 65 %) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo a lo largo del tiempo son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas.

13.2 **Control positivo (tóxico de referencia):** Como forma de asegurar la validez de los resultados analíticos, realizar mensualmente un test con el tóxico de referencia (Sulfato de Cinc). Registrar los resultados obtenidos en el gráfico de control correspondiente.

Se debe establecer la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo). A tales efectos se realizan cartas control para evaluar el crecimiento en el control positivo, determinando el promedio y los límites de control (promedio ± 3 SD) de la elongación de la radícula.

13.3 **Control de precisión:** Cada vez que se analicen muestras, deberán realizarse 3 réplicas por tratamiento. Al finalizar los 5 días de incubación, el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD), utilizado como medida de dispersión de los resultados, deberá ser inferior al 30 % en la elongación de radícula de las tres réplicas de cada tratamiento.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1 U.S EPA. Ecological effects test guidelines. OPPYS 850.4200. Seed Germination /Root Elongation Toxicity Test. Abril 1996

14.2 G. Castillo (ed.). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (IDRC), Instituto Mexicano de tecnología del Agua (IMTA), Canadá. 202 pp.

https://prd-idrc.azureedge.net/sites/default/files/openebooks/147-7/index.html#page_71

14.3 American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Section 8010 Preparing organisms for toxicity tests, Tabla 8010:1, pp 874. Section 8220, Aquatic Emergent plant. pp 935-939.

14.4 Metodología para el bioensayo de toxicidad aguda y crónica con semillas de trigo (Triticum eastivum). 2015. Laboratorio de Bioensayos, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

14.5 Qureshi, A. A. Microbiology Methods Manual. Vegreville, Alberta: Alberta Environmental Centre; 1990. Pp: 3-89.

Anexo 1: Condiciones generales del test

Tipo de test	Estático.
Duración del test	5 días.
Temperatura	25 ± 1 ºC.
Iluminación	En oscuridad.
Recipiente de test	Placas de Petri.
Volumen de muestra	4 mL.
Agua de dilución	Agua dura reconstituida.
Organismos del test	Semillas de *Lactuca sativa*.
Nº de concentraciones	5 más el control negativo.
Nº réplicas	3 réplicas por cada concentración.
Nº de semillas por réplica	Al menos 10 (se recomiendan 15 semillas).
Filtración	No se requiere.
pH	No se requiere ajuste si el pH de la muestra se encuentra entre 6.5-9.5 en las diluciones del test. Se debe medir al comienzo y al final del test, en al menos 2 concentraciones.
Punto final	IC_{50} = concentración de la muestra que produce una inhibición en la elongación de la radícula en un 50% respecto al control. Alternativamente se puede determinar como punto final la inhibición en la germinación respecto al control (cuando no hay aparición visible de la radícula).
Tóxico de referencia	Solución 100 mg/L de Sulfato de Cinc ($ZnSO_4$).
Validez del test	- Germinación en control negativo > 65 %. Tamaño de las radículas de al menos 2 cm. - CV de la elongación de la radícula en el control negativo ≤ 30 %. - Rango normalizado de las 3 réplicas de cada concentración testeada de la muestra ≤ 30 %.

6201UY

Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad

Obtención de solución resultante del test de lixiviación (lixiviado) en agua desionizada durante 24hs.

Elaborado - G. Pistone

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica describe los pasos necesarios que se deben realizar antes de llevar a cabo ensayos de ecotoxicidad en residuos, tanto sólidos como líquidos. Dichos ensayos permiten identificar las propiedades potencialmente peligrosas para el medio ambiente de los residuos, con vistas a su clasificación.

1.2. El enfoque de medir la ecotoxicidad a través de ensayos biológicos, resulta particularmente importante en los residuos, ya que los mismos generalmente son una mezcla compleja de composición desconocida. Los bioensayos integran los efectos de todos los contaminantes presentes en la muestra, incluidos los efectos aditivos, sinérgicos y antagonistas. Además son sensibles a la fracción biodisponible de los contaminantes.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental de DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento “Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos, industriales, sedimentos, suelos)” (1050UY).

2.6. Ruta de análisis (RMB 12).

2.7. Instructivos de uso de equipos balanza de humedad (INE 113).

2.8. Instructivo de uso analizador de pH (INE 98).

2.9. Instructivo de uso equipo de agitación (lixiviador, INE 66).

2.10. Instructivo de uso centrífuga (INE 124).

2.11. Instructivo de uso balanza de resolución 0,1 g (INE 06).

2.12. Instructivo de uso desionizador Millipore Elix Essentials (INE 121).

2.13. ES01: Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA.

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. En aquellos casos en los que se requiera, se realiza un pretratamiento de la muestra para obtener un tamaño de partículas menor a 4 mm. Se pesa una porción de la muestra y se mezcla con una cantidad de fluido extractante (agua desionizada) en una relación sólido-líquido igual a 1:10.

3.2. Se coloca en un sistema rotatorio y se hace girar a 5 - 10 r/min durante 24 h ± 0,5 h, a una temperatura entre 15 °C - 25 °C.

3.3. El fluido extractante que se obtiene se filtra a través de un filtro de membrana de 0,45 µm para obtener de esta manera el lixiviado.

3.4. La caracterización ecotoxicológica posterior se realiza de acuerdo a los procedimientos correspondientes a los distintos ensayos de ecotoxicidad.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.2. Tener la precaución de que en la mayoría de los casos se va a estar trabajando con material peligroso, por su alta carga potencial de contaminantes tóxicos.

4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. En general se aconseja recolectar un mínimo de 1000 g de muestra, pero la cantidad de muestra dependerá del número de ensayos a realizar y de los requisitos de los métodos biológicos que se van a llevar a cabo.

6.2. Debido a la alta toxicidad potencial de estas muestras se requiere tomar especiales medidas de seguridad en su manejo.

6.3. El transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse en oscuridad, bajo refrigeración y en envases herméticos completamente llenos con el residuo para el ensayo. En aquellos lodos o residuos activos desde el punto de vista microbiológico, en los que se sospeche la posible generación de gases y, por tanto, exista riesgo de explosión, los envases no deberán llenarse completamente dejando un espacio de cabeza que no exceda el 10 % de su capacidad total.

6.4. Los residuos deberán almacenarse en bolsas de nylon, envases de polietileno, polipropileno, PTFE o vidrio.

6.5. El tiempo de almacenamiento debe ser el menor posible; el tiempo máximo de almacenamiento es de 2 meses, bajo condiciones de refrigeración (la congelación puede inducir cambios en las características de la muestra).

6.6. En ningún caso se le deben agregar sustancias de preservación a la muestra antes de la extracción.

6.7. Los ensayos ecotoxicológicos deben comenzar inmediatamente después de la obtención del lixiviado, y en ningún caso más allá de las 72 h siguientes a su obtención. Si se realiza un ensayo preliminar para determinar el rango de diluciones apropiadas, y posteriormente un ensayo definitivo, este último debe completarse dentro de los 10 días posteriores a la producción del lixiviado.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de agitación: debe ser capaz de mantener una agitación permanente durante el periodo de lixiviación (24 h ± 0,5 h) de manera tal que el sólido no se estratifique. Se recomienda un equipo que pueda agitar los recipientes de extracción por inversión entre 5-10 r/min (véase Anexo 1).

7.2. Recipientes de extracción: se necesitan recipientes con suficiente capacidad para contener la muestra y el reactivo de extracción (mínimo 1 litro de capacidad). Pueden ser de vidrio o plástico (polietileno de alta densidad o polipropileno).

7.3. Sistema de filtración a vacío (entre 30 y 70 kPa; 300 mbar a 700 mbar) o un aparato de filtración de alta presión (< 0,5 mPa; 5 bars).

7.4. Filtros de nylon o PTFE de 0,45 µm de tamaño de poro.

7.5. Medidor de pH.

7.6. Balanza de resolución de 0,01 g.

7.7. Equipo de tamizado con tamices de 4 mm de tamaño nominal de luz.

7.8. Centrífuga que funcione a 2000 g.

7.9. Balanza de humedad o en su defecto estufa con control de temperatura para trabajar a 105 °C ± 5 °C.

8. REACTIVOS

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. **Pre-tratamiento de los residuos (trituración y tamizado).**

El ensayo de lixiviación debe realizarse sobre materiales cuyo tamaño de partícula sea menor a 4 mm en al menos el 95 % de la masa total. Cuando la fracción que excede dicho tamaño supere el 5 %, esta debe triturarse en su totalidad. El material no triturable (por ejemplo, partes metálicas como tuercas, pernos, chatarra) debe separarse, registrando tanto su peso como su naturaleza. Independientemente de cualquier reducción de tamaño necesaria, las fracciones separadas, con excepción del material no triturable, deben ser mezcladas para constituir la muestra del ensayo. Si la muestra de laboratorio no se puede triturar o tamizar a causa de su humedad se permite, únicamente en este caso, secar la muestra a una temperatura que no exceda los 40 °C.

11.2. **Determinación de la tasa de contenido de materia seca y humedad.**

11.2.1. El contenido de humedad debe determinarse según el procedimiento operativo 1050UY.

11.2.2. La tasa de contenido de materia seca (DR) se calcula de la siguiente forma:

$$DR\ (\%) = 100 \times (Md/Mw)$$

donde:

Md: corresponde a la masa de la porción de ensayo seca (kg).

Mw: corresponde a la masa de la porción de ensayo antes del secado (kg).

11.2.3. La tasa de contenido de humedad (MC) se calcula de la siguiente forma:

$$MC\ (\%) = \frac{100 \times (Mw - Md)}{Md}$$

Nota 1: el contenido de agua se calcula sobre la base de la materia seca (no de la materia bruta, o sea antes del secado).

11.3. **Procedimiento de lixiviación**

Para residuos monolíticos, residuos granulares, residuos pastosos y lodos:

11.3.1. Se coloca una porción de ensayo con una masa M correspondiente a 90 g ± 5 g de masa de materia seca (Md) en un recipiente con un volumen nominal de 1 L, minimizando el espacio de cabeza (≤ 5 % del total de capacidad del recipiente). Alternativamente puede utilizarse el doble de masa en un recipiente de 2 L, en función de la disponibilidad de recipientes de extracción y del volumen de lixiviado requerido para los análisis ecotoxicológicos. Cuando se requiere un volumen mayor de lixiviado, es posible realizar el ensayo en un vaso de capacidad adecuada, introduciendo el número necesario de porciones de ensayo. Otra opción es realizar ensayos de lixiviación en paralelo, de manera simultánea, y posteriormente mezclar los eluatos individuales para conformar la muestra de ensayo.

11.3.2. Se añade una cantidad de lixiviante (L) estableciendo una relación Líquido/Sólido (L/S) = 10 Litros/kg ± 2 %. Se deberá tener cuidado de obtener una buena mezcla entre el sólido y el líquido.

El volumen de lixiviante a agregar se calcula de la siguiente manera:

$$L\ (litros) = \left(10 - \frac{MC}{100}\right) \times Md$$

donde:

L: corresponde al volumen de lixiviante usado (en litros).

Md: corresponde a la masa seca de la porción de ensayo (en kg).

MC: corresponde a la tasa de contenido de humedad (en %).

11.3.3. Se sitúa el recipiente tapado en el equipo de agitación (agitador mecánico de inversión 5 a 10 r/min, véase Anexo 1). También se puede utilizar un agitador mecánico de rodillos rotando aproximadamente a 10 r/min. Se agita durante 24 h ± 0,5 h a temperatura ambiente.

11.3.4. Al finalizar el periodo de agitación, se deja que los sólidos en suspensión sedimenten durante 15 min ± 5 min. Cuando la separación entre las fases sólida y líquida no se logra en este período de tiempo, se centrifuga la muestra a 2000 g (fuerza centrífuga relativa, expresada en g). Si las características de la muestra impiden obtener un volumen de líquido suficiente a través de la centrifugación, podrán utilizarse otros métodos alternativos de separación, tales como prensado, tamizado, entre otros.

11.3.5. Posteriormente se filtra el fluido extractante preferentemente a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro usando un dispositivo de filtración a vacío o presión. Se recomienda el uso de filtros de PTFE (teflón) o de nylon en lugar de filtros de acetato o nitrato de celulosa. Si las condiciones de la muestra impiden el filtrado con el tamaño de poro previsto, se podrán utilizar, de forma alternativa, filtros con un tamaño de poro mayor. Al terminar la filtración no se debe lavar el filtro con agua ni con ningún otro disolvente. Esta filtración permite que las partículas en suspensión no interfieran en la realización del bioensayo.

11.3.6. Inmediatamente se mide el pH del lixiviado. Los ensayos deben realizarse sin ajuste de pH en la porción de ensayo. En caso de observarse efectos tóxicos en las diluciones atribuibles a valores de pH que impidan la supervivencia de los organismos, los ensayos pueden repetirse con ajuste de pH en la porción correspondiente. La realización de ensayos con ajuste de pH deberá reportarse en el informe de resultado.

Para lodos líquidos:

11.3.7. Las partículas de gran tamaño deberán separarse de los lodos por centrifugación durante 30 min a 2000 g. El extracto acuoso obtenido se filtrará según lo establecido en el punto 11.3.5. En lo relativo al pH, se procederá según lo indicado en el punto 11.3.6.

Residuos líquidos miscibles con agua:

11.3.8. No se requiere un procedimiento específico, el residuo líquido deberá emplearse en los ensayos de ecotoxicidad acuática después de la filtración (11.3.5), en caso de que esta resulte necesaria. En lo relativo al pH, se procederá según lo indicado en el punto 11.3.6.

Residuos líquidos no miscibles con agua:

11.3.9. Se añade una cantidad de lixiviante (L) estableciendo una relación líquido/líquido de 10.

11.3.10. Se sitúa el recipiente tapado en un dispositivo de agitación según lo establecido en el punto 11.3.3.

11.3.11. Al finalizar el periodo de agitación, se permitirá la separación de las dos fases durante 15 min ± 5 min. Cuando no se alcance la separación de las dos fases líquidas en este período de tiempo, la mezcla deberá ser centrifugada a 2000 g.

11.3.12. Posteriormente se filtra el extracto acuoso según 11.3.5. En lo relativo al pH, se procederá según lo indicado en el punto 11.3.6.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1 No aplica.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

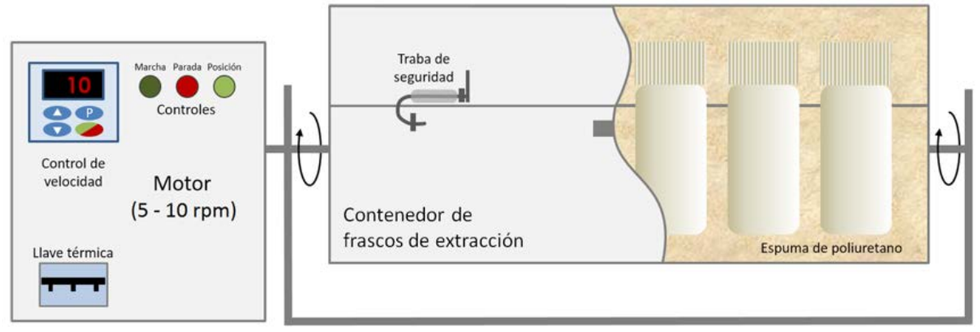
13.1 No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Norma UNE-EN 14735:2021 “Caracterización de residuos: Preparación de muestras de residuos para ensayos de ecotoxicidad”, (ratificada por la Asociación española de Normalización en enero 2022).

ANEXO 1

EQUIPO DE AGITACIÓN







SECCIÓN 7
Biológicos

7003UY

Determinación de ficocianina en muestras de aguas naturales

Método espectrofotométrico

Elaborado - A. Sanabria

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Microbiología

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta norma técnica se utiliza para la determinación de ficocianina encontrada principalmente en cianobacterias en aguas naturales.

1.2. El límite de detección es de 0,04 mg/L y el límite de cuantificación es de 0,12 mg/L en muestras de aguas naturales.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de bomba de vacío (INE 02).

2.6. Instructivo de uso de balanza (INE 16A e INE 16B).

2.7. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121).

2.8. Instructivo de equipo analizador de iones Thermo Scientific Orion VersaStar (INE 98).

2.9. Instructivo de uso de agitador vórtex (INE 44).

2.10. Instructivo de uso de centrífuga (INE 124).

2.11. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 156 e INE 99).

2.12. Instructivo de uso del baño de ultrasonido (INE 69).

2.13. Ruta de análisis (RMB 16).

2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. La ficocianina es un pigmento que se encuentra exclusivamente en cianobacterias, Cryptofitas, Rodofitas, Galucofitas y Dinofitas, pero en términos generales se la considera un marcador de la presencia de cianobacterias, ya que la mayoría de las células fitoplantónicas eucariotas carecen de este pigmento.

3.2. Un volumen conocido de agua, que contiene fitoplancton, se concentra por filtración en vacío, a través de un filtro de fibra de vidrio. Luego, se extrae la ficocianina mediante un ciclo de congelado – descongelado, y se resuspende en buffer salino. Finalmente, se mide la absorbancia a tres longitudes de onda: 620 nm, 650 nm y 750 nm, para determinar ficocianina y turbidez.

3.3. Para calcular la concentración de ficocianina (mg/L), se aplica la ecuación presentada en la sección 12 de este procedimiento a los valores de absorbancia corregidos por turbidez. No es necesario calibrar el método ni el instrumento con soluciones estándar, cada vez que se realice el procedimiento.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Emplear elementos de seguridad: túnica, guantes, lentes, de acuerdo a la naturaleza de las muestras en estudio.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier compuesto que absorba luz en 620 nm y en 650 nm puede interferir en la exactitud de las medidas de absorbancia de la muestra.

5.2. Se realiza una medida a 750 nm para determinar la turbidez. Con este valor se corrigen las medidas a 620 nm y a 650 nm. Una medida mayor a 0,0050 UA indica que la solución es poco clara, por lo que se debe centrifugar o filtrar la muestra, previo a la lectura.

5.3. Si bien se considera un marcador de la presencia de cianobacterias, como se indicó en el resumen del método, algunas microalgas eucariotas también contienen ficocianina.

5.4. La ficocianina es sensible a la luz y se degrada a temperaturas superiores a los 35 ˚C – 40 ˚C. Se debe trabajar con luz tenue y se debe evitar que la muestra supere esta temperatura.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. El volumen de muestra a recolectar depende de la densidad del fitoplancton en el agua. Recolectar 1 L de agua en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), color ámbar.

6.2. Todos los instrumentos usados para la recolección deben estar limpios y libres de ácido.

6.3. Filtrar la muestra dentro de las 24 h de extraída. Almacenar los filtros cubiertos con papel aluminio entre -20 ˚C y -25 ˚C), por un máximo de 7 días. Mientras no se filtra, la muestra debe permanecer en condiciones de refrigeración (2-8 ˚C) y en oscuridad.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro: visible, múltiple longitud de onda y resolución de 2 nm.

7.2. Centrífuga: capacidad de centrifugación 3220 x g.

7.3. Desionizador de agua (Millipore Elix Escentials o similar).

7.4. Bomba de vacío a presión máxima de 310 mBa.

7.5. Equipo de filtración, que consiste en un matraz de 1 L de polipropileno con un portafiltro de base de 47 mm de diámetro.

7.6. Pipeta automática de rango variable 1-10 mL con sus tips correspondientes.

7.7. Baño de ultrasonido.

7.8. Vórtex.

7.9. Heladera a 2-8 ˚C.

7.10. Freezer a -20 ˚C.

7.11. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).

7.12. Balanza de resolución 0,001 g.

7.13. Pinzas de punta chata.

7.14. Hojas de aluminio.

7.15. Filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, tamaño nominal de poro de 0,7 µm.

7.16. Filtro de jeringa no estéril; membrana de nylon, politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno, celulosa regenerada; 25 mm de diámetro; tamaño de poro 0,45 µm.

7.17. Jeringa de 10 mL.

7.18. Probeta graduada de capacidad 500 mL.

7.19. Tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL de capacidad, con tapa rosca.

7.20. Celda de vidrio para espectrofotómetro, de 1 cm de pase óptico.

7.21. Termómetro infrarrojo.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Buffers de pH 4, 7 y 10 para calibración de phmetro.

8.3. Reactivo Spirullina sp

8.4. Cloruro de sodio NaCl Nro. CAS 7647-14-5.

8.5. Cloruro de potasio KCl Nro. CAS 7447-40-7.

8.6. Fosfato disódico anhidro Na_2HPO_4 Nro. CAS 7558-79-4.

8.7. Fosfato de potasio monobásico anhidro KH_2PO_4 Nro. CAS 231-913-4.

8.8. Ácido etilendiaminotetraacetico, sal disódica Na_2EDTA Nro. CAS 6381-92-6.

8.9. Con los anteriores, preparar buffer salino de extracción de la siguiente forma:

- Adicionar 8,77 g de NaCl; 2,01 g de KCl; 11,36 g de Na_2HPO_4; 2,72 g de KH_2PO_4 y 3,72 g de Na_2EDTA y llevar a volumen final 1 L de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 7,45- 7,50 usando NaOH. A este pH aumenta la solubilidad de las sales.
- Almacenar hasta 6 meses a 2-8 ˚C.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Trabajar con luz tenue, y manteniendo las muestras alejadas de la luz intensa.

9.2. No exponer las muestras a temperaturas superiores a 35 ˚C – 40 ˚C.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Tratamiento de la muestra:

11.1. Filtrar 100 a 500 mL de la muestra de agua a través de un filtro de vidrio de 47 mm de diámetro, tamaño nominal de poro de 0,7 µm. Para evitar la lisis celular, el vacío máximo no debe exceder 310 mBa (presión residual 700 mBa). Registrar el volumen filtrado en el RMB16.

11.2. Secar el filtro presionando en un papel absorbente y cubrirlo con papel de aluminio, para evitar la degradación fotoquímica.

11.3. Las muestras pueden mantenerse hasta 7 días a – 20 ˚C.

11.4. Colocar el filtro en un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL de capacidad, con tapa rosca. Congelar y descongelar la muestra una vez, para inducir la lisis celular.

11.5. Agregar 10 mL de buffer salino de extracción y moler con mortero mecánico 1 min a 500 rpm/min.

11.6. Incubar el tubo a 2-8 ˚C por 16 h.

11.7. Sonicar por 10 minutos en un baño de ultrasonido con agua de la canilla y hielo (este paso reduce la turbidez de los extractos).

11.8. Centrifugar la muestra por 20 min, 3220 x g. Asegurarse de que no queden partículas del filtro remanentes en la parte superior del tubo.

Nota 1: verificar que luego de la centrifugación, las muestras no superen los 35 ˚C. Para ello, medir con el termómetro infrarrojo la temperatura en la base del tubo.

Lectura espectrofotométrica:

11.9. Cerar el espectrofotómetro con el buffer de extracción salino a 620 nm, 650 nm y 750 nm.

11.10. Filtrar a través de un filtro de jeringa unos 3 mL del sobrenadante, en una celda de vidrio del espectrofotómetro.

11.11. Medir la absorbancia a 620 nm, 650 nm y 750 nm. Registrar los valores de absorbancia en RMB16. La absorbancia de las muestras a 750 nm es un indicativo de la turbidez inespecífica de la muestra y debe estar en todos los casos por debajo de 0,0050 UA. Usar el valor de la absorbancia a 750 nm para corregir los valores leídos a 620 nm y 650 nm. Las lecturas corregidas a 620 nm deben estar entre 0,0030 y 0,3920 UA (rango de linealidad).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{Ficocianina (mg/L)} = \frac{(\text{Abs corr}_{620\,nm} - 0{,}7 \times \text{Abs corr}_{650\,nm})\ Ve}{7{,}38 \times Vs \times l}$$

dónde:

Ve es volumen del buffer salino de extracción en mL.

Vs es volumen de muestra en L.

I es el paso de la cubeta en cm.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control blanco:** se debe analizar una muestra blanco por cada corrida. Esa muestra blanco consiste en una muestra de 500 mL de agua desionizada que se filtra y extrae como cualquier muestra. Se utiliza para determinar una posible contaminación de reactivos o materiales. Los valores de absorbancia de este control no deben superar 0,0050 UA.

13.2. **Control de precisión:** se realiza como mínimo una muestra por duplicado por corrida. Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondientes.

13.3. **Curva de calibración anual:** Dado que no es necesario calibrar el método o el instrumento cada vez que se realiza este procedimiento, se realizará una curva de calibración anual, a partir de *Spirullina* sp, utilizando 5 puntos de concentraciones conocidas. Para ello, en ausencia de luz, se realizarán 5 tomas por peso de *Spirullina* (1 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg y 25 mg), en un volumen de 100 mL de agua deionizada cada una. Se extraerá el pigmento y se verificará, mediante un análisis de regresión lineal y un test de Student, que la pendiente de la curva de calibración anual no presenta diferencias significativas con las obtenidas durante la validación inicial.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Yepremian C., Arnaud C., Bernard C., Congestri R., Eleresk T., Pilkaityte R. SOP 3 : Phycocyanin Extraction and Determination. En: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Editado por Mariluoto J., Spoof L., Cood A. 2017. Wiley & Sons.

7004UY

Determinación de Clorofila-a y Feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina

Método espectrofotométrico de extracción con acetona

Elaborado - M. Menéndez

Modificado - M. Curto

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Fisicoquímico y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de clorofila-a y feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina.

1.2. La clorofila es el pigmento fotosintético esencial presente en todas las plantas verdes. La determinación de la concentración de clorofila-a provee información acerca de la cantidad (biomasa) y actividad fotosintética potencial de la mayor parte del fitoplancton presente en un cuerpo de agua (algas y cianobacterias), con la excepción de las bacterias fotosintéticas, las cuales carecen de dicho pigmento. El metabolito más importante de la clorofila es la feofitina. La relación entre clorofila y feofitina es indicativa del estado fisiológico de las algas.

1.3. El límite de detección es de 0,7 µg/L y el límite de cuantificación de 2,2 mg/L para clorofila-a. Y para feofitina son 1,9 µg/ y 5,6 µg/L respectivamente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso de bomba de vacío (INE 02).

2.6. Instructivo de uso de centrífuga (INE 49).

2.7. Instructivo de uso de analizador de pH (INE 98).

2.8. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Essentials (INE 121).

2.9. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 135 e INE 99).

2.10. Ruta de análisis (RMB 13).

2.11. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Se concentra, por filtración en vacío y a través de un filtro de fibra de vidrio, un volumen de muestra de agua conocido que contiene fitoplancton.

3.2. Los pigmentos se extraen del fitoplancton en acetona al 90 % con la ayuda de un mortero mecánico, dejando reposar entre 2 y 24 h.

3.3. El extracto se centrífuga a 675 x g durante 15 minutos (o 1000 x g durante 5 min) para clarificar la solución. Una alícuota del sobrenadante se transfiere a una celda de vidrio y se mide la absorbancia a tres longitudes de onda (664, 665 y 750 nm) para determinar clorofila-a, feofitina-a y turbidez respectivamente.

3.4. Se mide la absorbancia de la muestra a 750 y 664 nm antes de acidificar, y a 750 y 665 nm después de la acidificación con HCl 0,1 N.

3.5. Para calcular las concentraciones de los pigmentos se insertan los valores en una serie de ecuaciones que utilizan los coeficientes de extinción de los pigmentos puros en acetona al 90 %. Las concentraciones se expresan en mg/L. No es necesaria la calibración del método ni del instrumento con soluciones estándar, cada vez que se realice el procedimiento al utilizar dichas ecuaciones.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Utilizar implementos de seguridad: túnica, guantes, lentes, según la naturaleza de las muestras en estudio

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier compuesto que absorba luz entre 664 y 665 nm puede interferir en la exactitud de las medidas de absorbancia de la muestra.

5.2. Se realiza una medida a 750 nm para determinar la **turbidez**, la cual se resta de las medidas de las otras absorbancias a 664 y 665 nm. Una medida mayor a 0,005 U.A. indica una solución poco clara, lo cual se soluciona centrifugando o filtrando la muestra antes de realizar la lectura.

5.3. La cantidad relativa de clorofila a, b y c1+c2 varía con la **composición taxonómica** del fitoplancton y en soluciones que contienen todos los pigmentos es inevitable la sobre o subestimación de los pigmentos debido a la superposición espectral de las clorofilas y las feofitinas.

El valor de feofitina-a puede resultar sobrestimado en presencia de determinados carotenoides y tras la acidificación de la muestra, debido a la conversión de la clorofila-b en feofitina-b. El grado de conversión de clorofila-b a feofitina-b es más lento que el de clorofila-a. Por lo tanto, es importante dejar transcurrir el mínimo tiempo necesario para convertir clorofila-a a feofitina-a, antes de medir la absorbancia a 665 nm, el cual se recomienda que sea de 90 segundos.

5.4. Todos los pigmentos fotosintéticos son sensibles a **la luz**. El trabajo se debe realizar con luz tenue y todos los materiales estándares de control de calidad y muestras filtradas se deben almacenar en la oscuridad entre -20 °C y -70 °C para prevenir la rápida degradación.

5.5. Las muestras de agua con **pH < 6** deben analizarse lo antes posible después de filtrarlas, para evitar la posible degradación de la clorofila causada por el agua residual retenida en el filtro.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. El volumen de muestra a recolectar depende de la densidad del fitoplancton en el agua.

6.2. Para su análisis en aguas oceánicas se requieren 4 L, mientras que en lagos y estuarios 1 L es suficiente. Recolectar la muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), color ámbar.

6.3. Todos los instrumentos usados para la recolección deben estar limpios y libres de ácido.

6.4. Realizar el análisis lo antes posible luego de recolectada la muestra. Si la muestra presenta un pH mayor o igual a 6 y no se va a analizar inmediatamente, filtrar la muestra dentro de las 24 h y almacenar los filtros cubiertos con papel de aluminio a temperatura entre - 20 °C y - 70 °C, por un máximo de 28 días. Mientras no se filtre, la muestra debe ser refrigerada entre 2 y 8 °C, en oscuridad.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Espectrofotómetro: visible, múltiple longitud de onda y resolución de 2 nm.

7.2. Centrifuga: capacidad de centrifugación a 675 x g o a 1000 x g.

7.3. Mortero mecánico para tejidos: mano de mortero de teflón 50 mm x 20 mm, varilla de acero inoxidable ¼", tubo de vidrio de 30 mL de capacidad.

7.4. Filtros de fibra de vidrio: 47 mm, tamaño nominal de poro de 0,7 µm.

7.5. Hojas de aluminio.

7.6. Timer.

7.7. Pinzas con punta chata.

7.8. Bomba de vacío: capacidad para filtrar a 6 inHg (20 kPa).

7.9. Pipetas automáticas de rango variable 40-100 µL, 100-1000 µL, y 1-10 mL con los tips correspondientes.

7.10. Probetas graduadas, capacidad 100 mL y 500 mil.

7.11. Celdas de vidrio para espectrofotómetro.

7.12. Equipo de filtración, consistente de un matraz de 1 L de polipropileno con un portafiltro de base de 47 mm de diámetro.

7.13. Tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL de capacidad, con tapa rosca.

7.14. Pisetas de polietileno.

7.15. Filtro de jeringa no estéril; membrana de nylon, politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno, celulosa regenerada; 25 mm de diámetro; tamaño de poro 0,45 µm.

7.16. Heladera con temperatura entre 2 y 8 °C.

7.17. Freezer temperatura entre -20 y -70 °C.

7.18. Jeringa de 10 mL.

7.19. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar).

7.20. Desionizador de agua (Millipore Elix Essentials o similar).

7.21. Campana extractora.

8. REACTIVOS

8.1. Acetona UltimAR®, grado espectrofotométrico.

8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado. Solución de HCl 0,1 N. Agregar 8,5 mL de HCl concentrado a 500 mL de agua y llevar a 1 L.

8.3. Agua desionizada (según ES 01).

8.4. Solución acuosa de acetona (CH_3COCH_3 Nro. CAS 67-64-1): 90 % acetona / 10 % agua desionizada.

8.5. Estándar de clorofila-a from Spinach: C-5753, Sigma. Ampolla de vidrio de color ámbar de 1 mg. Almacenar en oscuridad a -20 °C. (Opcional).

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Filtrar al vacío, a través de un filtro de vidrio, al menos 1 L de muestra en un ambiente con luz tenue, tomando en cuenta los siguientes requerimientos: el vacío no debe exceder las 6 inHg y el tiempo de filtración debe ser menor a 10 min para evitar la rotura de células y en consecuencia la pérdida de clorofila. Enjuagar el recipiente de la muestra con 20 mL de agua y pasarla por el filtro para asegurarse de que se colecten todas las células. En caso de taparse el filtro antes de filtrar 1 L considerar lo filtrado y anotar el volumen.

11.2. Retirar el filtro con una pinza y si no se va a realizar la extracción inmediatamente, doblar el filtro, secarlo con papel absorbente y cubrirlo con una hoja de aluminio,asegurándose de que la superficie filtrada no quede en contacto con el aluminio. Guardarlo en el freezer a -20 °C o temperatura menor, hasta un máximo de 28 días.

11.3. El filtro con muestra recién obtenida, o el proveniente del freezer, se trata de la siguiente manera: romper con la pinza el filtro en trozos pequeños y empujarlos hasta el fondo del tubo de centrífuga de 50 mL.

11.4. Agregar 4 mL de solución acuosa de acetona al 90 % con una pipeta (el volumen final de la extracción será de 10 mL).

11.5. Moler con mortero mecánico 1 min a 500 r/min, en campana extractora.

11.6. Enjuagar el mortero con la solución de extracción (acetona 90 %), completando el tubo hasta llegar a los 10 mL.

11.7. Dejar reposar en la oscuridad y en heladera por un mínimo de 2 h pero no más de 24 h. Agitar 2 o 3 veces durante el período de reposo y tratar a todas las muestras de la corrida igual con respecto al tiempo de reposo.

Antes de continuar con el procedimiento, encender el espectrofotómetro y dejar calentar durante aproximadamente 30 min. Cerar el equipo con acetona al 90 % a todas las longitudes de onda (664 nm, 665 nm y 750 nm). Usar celda de vidrio de 1 cm de paso óptico.

11.8. Centrifugar las muestras durante 15 min a 675 x g, o 5 min a 1000 x g.

11.9. Colocar la muestra en un lugar oscuro antes de obtener las medidas de absorbancia en el espectrofotómetro.

11.10. Cerar el espectrofotómetro con acetona al 90 % a 664 nm, 665 nm y 750 nm.

11.11. Antes de medir la absorbancia, filtrar siempre el sobrenadante del extracto utilizando un filtro de jeringa. Luego, pipetear 3 mL del filtrado en una celda de vidrio del espectrofotómetro.

11.12. Medir la absorbancia a 664 nm y 750 nm. Si la medida de absorbancia de la muestra a 750 nm excede las 0,0050 UA, se debe volver a filtrar la muestra a través de un filtro de jeringa y medir nuevamente. Por otro lado, si la señal a la longitud de onda seleccionada es mayor a 0,9000 UA (unidades de absorbancia), diluir y medir nuevamente.

11.13. Acidificar la muestra en la celda del espectrofotómetro con HCl 0,1 N hasta obtener una concentración no mayor a HCl 0,003 N. Por ejemplo, una celda con 3 mL de muestra requiere 90 µL de HCl 0,1 N para obtener una concentración de ácido 0,003 N.

11.14. Mezclar bien la muestra utilizando una pipeta de 1000 µL, aspirando y expulsando la muestra dentro de la cubeta pero sin airearla demasiado (para esto no se debe sacar la punta del tip de la solución). Esperar 90 segundos y medir la absorbancia a 750 nm y 665 nm. Es crítico el mezclado apropiado de la muestra con el ácido para obtener resultados precisos y exactos.

11.15. Si se va a utilizar el mismo material para muestras diferentes realizar un lavado con acetona al 90 % entre cada muestra.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. ECUACIÓN DE LORENZEN para la determinación de clorofila-a y feofitina-a en el extracto.

- Restar los valores de absorbancia a 750 nm de los valores de absorbancia a 664 nm y 665 nm.
- Calcular las concentraciones de clorofila-a y feofitina-a en el extracto insertando los valores de absorbancia corregidos a las siguientes ecuaciones:

$$C_{E,a} = 26,7 \times (A_{664a} - A_{665d})$$

$$P_{E,a} = 26,7 \times (1,7 \times A_{665d} - A_{664a})$$

donde:

$C_{E,a}$: corresponde a la concentración en mg/L de Clorofila-a en el extracto.

$P_{E,a}$: corresponde a la concentración en mg/L de Feofitina-a en el extracto.

A_{664a}: corresponde a la absorbancia del extracto a 664 nm, corregida por turbidez y medida antes de acidificar.

A_{665d}: corresponde a la absorbancia del extracto a 665 nm, corregida por turbidez y medida después de acidificar.

12.2. ECUACIÓN GENERAL para la determinación de clorofila-a y feofitina-a en la muestra.

- Calcular las concentraciones de los pigmentos en toda la muestra de agua usando la siguiente ecuación general:

$$Cs = \frac{C_{E(s)} \times \text{volumen de extracto (L)} \times DF}{\text{Volumen de muestra (L)} \times \text{longitud de la celda (cm)}}$$

donde:

Cs: corresponde a la concentración en mg/L de pigmento en toda la muestra de agua.

CE (s): corresponde a la concentración en mg/L del pigmento en el extracto medido en la celda.

Volumen de extracto: corresponde al volumen en L de extracto antes de diluir (típicamente 0,010 L; 10 mL).

DF: corresponde al factor de dilución (en el caso que haya sido necesario diluir la muestra).

Volumen de muestra: corresponde al volumen en L de toda la muestra de agua que se filtró.

Longitud de celda: corresponde al camino óptico en cm de la cubeta usada (típicamente 1 cm).

12.3. Las muestras de agua con una razón: (664 antes de acidificar)/(665 después acidificar) = 1,70 no contienen feofitina-a. Esto implica que los fotótrofos atrapados en la muestra se encontraban en un excelente estado fisiológico al momento de realizarse el muestreo. Soluciones puras de feofitina-a no registran reducción en la absorbancia a 665 nm luego de la acidificación, presentando entonces una razón: (664 antes de acidificar)/(665 después acidificar) = 1,0. Por ende, las muestras de agua donde tenemos mezclas de clorofila-a y feofitina-a presentarán una razón de absorción 664 nm/665 nm que variará entre 1,0 y 1,7.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. Se debe analizar un reactivo blanco por cada corrida de muestras. Este reactivo es un filtro blanco que se extrae y analiza como cualquier otra muestra. Se utiliza para determinar la posible contaminación de reactivos o materiales. Los valores de absorbancia del mismo deben ser < 0,005 U.A.

13.2. Analizar cada cinco muestras, una por duplicado (o al menos 1 duplicado por batch). Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondiente.

13.3. Dado que no se requiere calibrar el método ni el instrumento con soluciones estándar cada vez que se realice este procedimiento, se debe realizar al menos una vez al año una curva de calibración. Esta se realizará a partir de una solución estándar de clorofila-a, utilizando como mínimo 5 puntos con concentraciones entre 1 y 15 mg/L.

La solución estándar de Clorofila-a se debe preparar en ausencia de luz. Se transfiere el contenido de la ampolla (1 mg) a un matraz conteniendo 25 mL de acetona al 90 %. Se logra así una concentración de 40 mg/L. Recubrir el matraz con papel de aluminio para protegerlo de la luz. En la siguiente tabla se muestran las posibles diluciones para realizar la curva de calibración a partir de la solución estándar de clorofila-a, estás se llevan a un volumen final de 10 mL.

Los resultados obtenidos deben ser contrastados con los resultados obtenidos en la validación inicial.

Concentración de la solución a preparar (mg/L)	Toma de la solución estándar (mL)
1	0,25
3	0,75
6	1,5
9	2,2
12	3
15	3,8

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. U.S EPA (setiembre 1997). Method 446.0. In Vitro determination of Clorophylls a, b, c1+c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. Revisión 1.2. National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development. Cincinnati, Ohio.

14.2. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th ed. Washington DC: APHA Press; 2023. Chlorophyll A 10150 B Spectrophotometric Determination of Chlorophyll A. pp. 1341-1343.

7005UY

Determinación de microcistinas totales en aguas naturales

Método inmunoensayo ELISA *(enzyme-linked-immuno-sorbent-assay)*

Elaborado - N. Martin

Modificado - V. Croce

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de microcistinas totales (MCs) en aguas naturales.

1.2. Mediante este procedimiento se pueden determinar microcistinas totales en un rango lineal de 0,6 a 2,5 µg/L. El límite de detección y cuantificación son 0,2 µg/L y 0,6 µg/L, respectivamente. Es posible determinar niveles mayores de microcistinas totales por dilución de la muestra.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento 7006UY Determinación de microcistina Leucenina-Arginina (MC-LR) en aguas naturales por extracción en fase sólida (SPE) y determinación por cromatografía líquida con detección ultravioleta (UV).

2.6. Procedimiento 7004UY Determinación de Clorofila-a y Feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina.

2.7. Instructivo de uso desionizador Millipore Elix Essential (INE 121)

2.8. Instructivo de uso lector de placa de Epoch (Biotek) (INE 132).

2.9. Ruta de análisis (RMB 14).

2.10. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El ensayo implementado corresponde a un ELISA policlonal, competitivo e indirecto, en el cual el anticuerpo compite entre la microcistina libre presente en la muestra y la microcistina inmovilizada en la placa. El método permite determinar la toxicidad global de la muestra sin discriminar entre las distintas variantes de microcistinas, dado que el anticuerpo presenta reactividad cruzada frente a numerosas microcistinas. Por lo tanto, el resultado representa el contenido total de las mismas en la muestra, en función de la afinidad del anticuerpo utilizado por las diferentes variantes.

3.2. Las microcistinas son un grupo de más de ochenta heptapéptidos cíclicos de amplia distribución tanto en agua dulce como salobre (particularmente en sistemas de transición dulce–marinos).

3.3. La determinación del contenido de clorofila-a, permite orientar el nivel de microcistinas esperable en la muestra, siendo recomendable contar con este valor previo al inicio del análisis. La OMS establece para aguas recreacionales una relación aproximada de 2-4 µg MC/L cuando la concentración de clorofila a es del orden de 10 µg /L.

3.4. Las distintas variantes de microcistinas no se unen con la misma eficiencia a los anticuerpos. Estas diferencias de reactividad no se correlacionan necesariamente con sus niveles relativos de toxicidad, sino que se deben a variaciones estructurales entre las moléculas.

3.5. El método de ELISA se caracteriza por su alta sensibilidad, aunque no es selectivo para la identificación individual de variantes de microcistinas.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. A las microcistinas se les atribuyen efectos nocivos, tanto agudos como crónicos por ingestión (hepatotóxicas) y contacto dérmico (reacción de hipersensibilidad con la piel).

4.2. Se requiere el uso de túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.3. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.4. Al finalizar el ensayo el contenido de la placa es un residuo ácido el cual debe ser neutralizado previo a su descarte por pileta. A la placa se le efectúan múltiples enjuagues con agua previo a su disposición final.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier sustancia presente en la muestra que se una al anticuerpo anti-microcistinas policlonal de conejo generará un efecto matriz positivo en la determinación.

5.2. Para evitar contaminación cruzada ente muestras, se recomienda filtrar primero las muestras que se estima que tienen un menor contenido de microcistinas. En caso de reutilizar la jeringa y el cartucho entre muestras, efectuar lavado con agua desionizada. El lavado del material de vidrio a reutilizarse se efectúa con agua y jabón, y finalmente triple enjuague con agua desionizada.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno de alta densidad (PEHD) opaco de 1,0 L de capacidad. Preservar las muestras a temperatura < 10 °C las primeras 48 horas desde el muestreo. Las muestras deben ser analizadas tan pronto como sea posible desde su recepción al laboratorio y no superar los 33 días desde el muestreo conservadas en freezer a ≤ -20 °C.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Lector de placas de ELISA Epoch (Biotek), con el software Gen5 2.03.

7.2. Pipetas multicanal Eppendorf Xplorer (8 o 12 canales) de 5-100 µL y 50-1200 µL, con sus respectivos tips.

7.3. Pipetas automáticas de 20-200 µL y 100-1000 µL, con sus respectivos tips.

7.4. Agitador orbital de placa Senova.

7.5. Vortex.

7.6. Jeringa de vidrio de 10 mL.

7.7. Filtro jeringa de fibra de vidrio/teflón (FV/PTFE, 30 mm × 0,45 µm tamaño de poro).

7.8. Cubetas dispensadoras de reactivo (25 mL).

7.9. Tapa de placa forrada en papel de aluminio.

7.10. Viales ámbar de 4 mL con contratapa teflonada.

7.11. Tubos de vidrio de 15 mL para diluciones de muestras.

7.12. Frasco de vidrio ámbar de 40 mL con contratapa teflonada.

7.13. Gradilla.

7.14. Papel absorbente.

7.15. Timer.

7.16. Heladera.

7.17. Freezer a temperatura de -20 °C o inferior.

7.18. Centrífuga con rotor apto para tubos de 15 o 50 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (según ES 01).

8.2. Placa sensibilizada y reactiva provista por el kit de producción nacional. El kit provee:

8.2.1. Placa de Elisa sensibilizada con antígeno (microcistina unida a proteínas adsorbidas en la placa).

8.2.2. Buffer fosfato salino (PBS 10X).

8.2.3. Detergente Tween 20.

8.2.4. Preparar la solución de lavado (PBS-T) diluyendo 10 veces el buffer PBS 10X (8.2.2) en agua desionizada, y agregar Tween 20 (8.2.3); 0,05 % (v/v), o sea 0,05 mL en 100 mL.

8.2.5. Buffer diluyente de muestras (PBS-A): Buffer PBS 1X, Ázida de sodio, 0,05 % (m/v), o sea 0,05 g en 100 mL.

8.2.6. Soluciones estándares de MC-LR en PBS-A a los niveles: 0,2; 0,6; 1,0; 1,5 y 2,5 µg/L.

8.2.7. Solución control externo a la calibración de MC-LR en PBS-A a 1,0 µg/L.

8.2.8. Solución de anticuerpo anti-microcistinas policlonal de conejo (Ac anti-MC- HRP).

8.2.9. Anticuerpo anti-conejo-peroxidasa (Ac anti-Rabbit-PO)

8.2.10. Buffer del anticuerpo anti-conejo-peroxidasa (Buffer-HRP)

8.2.11. Buffer Acetato de sodio (Buffer Acetato) 0,1 M a pH 5,5 en agua desionizada.

8.2.12. Buffer Interferencia (Buffer Interferencia).

8.2.13. Solución de sustrato (TMB): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 0,6 % (m/v) en dimetil-sulfóxido (DMSO).

8.2.14. Solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) 6 % (v/v) en agua desionizada.

8.2.15. Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N en agua desionizada.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Usar guantes para todas las manipulaciones durante la ejecución del inmunoensayo.

9.2. La consistencia de los resultados obtenidos en las determinaciones por inmunoensayos depende fundamentalmente de la meticulosidad del analista, exactitud de los volúmenes de pipeteo, exactitud períodos de incubación, secuencia de agregado de reactivos entre los distintos pozos de la placa, entre otros.

9.3. Conservar los reactivos y la placa sensibilizada a <6 °C (>0 °C) a excepción del anticuerpo anti-conejo-peroxidasa el cual se conserva a -20 °C junto a un refrigerante (máximo un año).

9.4. Proteger la placa de la luz (tapa de la placa forrada en papel de aluminio) y del material particulado durante todo momento de manipulación.

9.5. Al realizar los tres ciclos de congelado/descongelado de la placa, contemplar la expansión del volumen para evitar la fractura del recipiente de muestreo.

9.6. Minimizar la utilización de plásticos en las distintas etapas de la metodología analítica todo cuanto sea posible, dada la pérdida de microcistinas por la adsorción a superficies plásticas (para los congéneres con aminoácido arginina se reportan menores pérdidas).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Incluir en cada batch de análisis por lo menos 5 soluciones estándares (8.2.6), un control de calibración externo (8.2.7) y un blanco (8.2.5). Se recomienda incluir el blanco en múltiples pozos de la placa con el fin de evaluar la posible deriva del ensayo por humedad, secuencialidad de pipeteo, variación de periodo de incubación, entre otros factores.

10.2. Registrar la lectura de absorbancia a 450 nm y 620 nm, y realizar la gráfica tal como se describe en 12.3.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Tratamiento previo de la muestra

11.1. Someter la muestra a tres ciclos de congelado (-20 °C), descongelado (temperatura ambiente) en el mismo recipiente de muestreo para la liberación de microcistinas intracelulares. No es necesario efectuar estos ciclos en días consecutivos.

11.2. Agitar vigorosamente la muestra y filtrar 5 mL de muestra por filtro jeringa FV/PTFE (7.7) para sacar interferencias, con jeringa de vidrio (7.6). Recoger el filtrado en viales ámbar de 4 mL (7.10).

Nota 1: Debido a que la filtración de las muestras es un proceso que implica un alto consumo de tiempo, se recomienda filtrar el día previo. En caso que las muestras presenten una alta carga de sedimentos, se pueden centrifugar por 5 min a 1000 xg, previo a filtrarlos.

11.3. Efectuar las diluciones recomendadas de las muestras según el contenido de clorofila-a previamente determinado. Realizar las diluciones en tubos de vidrio de 15 mL (7.11), empleando PBS-A como diluyente, según el siguiente cuadro:

Probabilidad de presencia de cianobacterias/toxinas	Clorofila-a (µg/L)	Niveles estimados de microcistinas (µg/L)	Diluciones recomendadas para ELISA*
Baja	≤ 10	< 10	1:1 y 1:2
Moderada	10-50	2-4	1:2 y 1:10
Alta	>50	>20	1:10; 1:100 y 1:1000

*Estas diluciones son orientativas; el laboratorio debe realizar diluciones adicionales según resultados obtenidos. Basado en EPA, 2019.

Análisis de la muestra

11.4. Permitir que muestras, reactivos y placa sensibilizada alcancen temperatura ambiente previo a la ejecución del ensayo (mínimo 30 minutos).

11.5. Diluir buffer de lavado PBS-T 10x: para una placa tomar 100 mL de PBS-T y llevar a 1 litro con agua desionizada.

11.6. Diseñar y registrar distribución de siembra de placa en RMB 14. A modo de ejemplo, el diseño podría establecerse como se plantea a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0,2	0,6	1,0	1,5	2,5	C					
B	0	0,2	0,6	1,0	1,5	2,5	C					
C	0	0,2	0,6	1,0	1,5	2,5	C					
D												
E												
F												
G												
H												

(0) Blanco (PSA-A), (0,2) Std. 0,2 µg/L, (0,6) Std. 0.6 µg/L, (1,0) Std. 1,0 µg/L, (1,5) Std. 1,5 µg/L, (2,5) Std. 2,5 µg/L, (C) control externo de calibración 1,0 µg/L.

11.7. Pipetear 50 µL en cada pozo por triplicado de: soluciones estándares, solución control externo y blanco (PBS-A). Sembrar las dos diluciones de muestras recomendadas en 11.3 por duplicado.

11.8. En una cubeta dispensadora de reactivos pipetear 1340 µL de Buffer Interferencia a 6 mL de Ac anti-MC (volumen para una placa). Esta dilución se debe efectuar en el momento de uso.

11.9. Efectuar una homogenización de la dilución de la cubeta dispensadora descripta anteriormente (11.7) con la pipeta multicanal (7.2) (modo: P/M, volumen: 100 µL, velocidad de ascenso y descenso del líquido de 8).

Pipetear 60 µL en cada pozo de la solución anteriormente descripta (11.7) (modo: Pip, volumen: 60 µL, velocidad de ascenso y descenso del líquido: 8 y 2, respectivamente).

11.10. Cubrir la placa con la tapa forrada con papel de aluminio e incubar la placa durante 50 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital a 200 rpm.

11.11. Remover la cubierta, descartar el contenido de los pozos en pileta, y secar la placa golpeando enérgicamente la placa invertida en una pila de papel adsorbente. Pipetear 300 µL PBS-T (solución de lavado) por pozo y descartar/secar la placa tal como fue descripto previamente. Repetir esta secuencia de lavado de placa en cuatro instancias.

11.12. En un frasco de vidrio de 40 mL dispensar 30 mL del Buffer-HRP y 1,0 µL del Ac anti-Rabbit-PO conservado a -20 °C (factor de dilución 1/30000). Esta dilución se debe efectuar en el momento de uso.

Nota 2: El factor de dilución del Ac anti-Rabbit-PO puede variar según el lote del kit. Se recomienda verificar el inserto cada vez que se cambie de lote.

11.13. Efectuar una homogenización de la dilución por vortex y verterlo en la cubeta dispensadora. Pipetear 100 µL en cada pozo de la solución anteriormente descripta (11.11) (modo: Pip, volumen: 100 µL, velocidad de ascenso y descenso del líquido: 8 y 4, respectivamente).

11.14. Cubrir la placa con la tapa forrada con papel de aluminio e incubar la placa durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital a 200 rpm.

11.15. Remover la cubierta, descartar el contenido de los pozos en pileta, y secar la placa golpeando enérgicamente la placa invertida en una pila de papel adsorbente. Pipetear 300 µL PBS-T (solución de lavado) por pozo y descartar/secar la placa tal como fue descripto previamente. Repetir esta secuencia de lavado de placa en siete instancias.

11.16. Secar la placa golpeándola enérgicamente sobre papel absorbente.

11.17. Preparación del sustrato: en una cubeta dispensadora de reactivos pipetear: 200 µL de TMB, 4,1 µL de H_2O_2 a 12,5mL de buffer Acetato, para la preparación de la solución sustrato. Esta dilución se debe efectuar en el momento de uso.

11.18. Efectuar una homogenización de la dilución de la cubeta dispensadora descripta anteriormente (11.15) con la pipeta multicanal (7.2) (modo: P/M, volumen: 100 µL, velocidad de ascenso y descenso del líquido de 8). Pipetear 100 µL en cada pozo de la solución anteriormente descripta (11.15) (modo: Pip, volumen: 100µL, velocidad de ascenso y descenso del líquido: 8 y 4, respectivamente).

11.19. Permitir el desarrollo de color lo cual lleva entre 10-12 min (proteger de la luz) con agitación orbital a 200 rpm. No exceder los 15 min.

11.20. Pipetear 50 µL en cada pozo de H_2SO_4 2N para detener la reacción.

11.21. Permitir la conversión total del color mediante la agitación orbital de la placa a 200 rpm durante 1 minuto.

11.22. Medir Absorbancia a 450 y 620 nm (λ de referencia).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular la Abs corregida (Abs_{corr}) mediante la resta de la Abs_{450nm} y Abs_{620nm}, pozo a pozo.

12.2. Promediar las réplicas analíticas determinadas para cada muestra, estándar, control externo y blanco.

12.3. Calcular el porcentaje de Abs relativa respecto al blanco (AO (%))

$$A_O\,(\%) = \frac{A_X \times 100}{A_O}$$

donde:

A_x corresponde al promedio de absorbancia de cada muestra y/o estándar

A_0 corresponde al promedio de absorbancia del blanco

Nota 3: El cálculo de A_0 (%) permite normalizar las diferencias entre diferentes corridas del ensayo.

12.4. Graficar el A0 (%) para cada estándar en el eje Y (escala lineal), y su correspondiente concentración en el eje X (escala logarítmica (logaritmo neperiano)). Se esperan los siguientes valores para los coeficientes regresores del modelo de regresión obtenido, pendiente entre 17-22 y ordenado en el origen no más de 60. La Abscorr del blanco (8.2.5) se espera tome valores entre 1,0 y 1,5 unidades de absorbancia. Valores más bajos de Abscorr del banco indican envejecimiento del Ac anti rabbit PO y son aceptables si se cumplen los restantes requisitos de calidad. Note que la pendiente es negativa

La ecuación de la recta es:

$$A_0\,(\%) = a\mathrm{Ln}(C)+b$$

Y la concentración de microcistinas totales expresada en µg/L es:

$$C = e[(A_0(\%)-b)/a]$$

12.5. Si la concentración de la muestra está entre 0,6-2,5 µg/L y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido y evaluar la confirmación de la concentración de MC-LR en la muestra por la metodología de referencia (SOP 7006UY).

12.6. Si el A_0 (%) de la muestra no diluida es mayor al A0 (%) del menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de detección.

12.7. Si el A_0 (%) de la muestra no diluida es mayor a la señal del estándar de 0,6 µg/L y menor a la señal del estándar de 0,2 µg/L, informar como comprendido ente el límite de detección y cuantificación.

12.8. Si el A_0 (%) de la muestra, es menor al del mayor punto de estándares de la curva de calibración, diluir la muestra y volver a analizar o informar como mayor a 2,5 µg/L.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. El coeficiente de **correlación de la curva** utilizada deberá ser $R^2 \geq 0,98$ y el **coeficiente de variación** para cada punto de la curva de calibración deberá ser menor a 10 %.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** evaluar la veracidad de la determinación, usando un estándar de concentración similar a la mitad del rango de la curva, preparado desde una fuente independiente a la utilizada para la construcción de la curva (8.2.7). Podrá utilizarse una solución de control interno o un material de referencia como solución control externo de calibración. La recuperación del valor de concentración real deberá estar entre (70-130) %, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de la precisión:** se debe realizar el análisis por duplicado. Verificar que el coeficiente de variación de los duplicados sea menor a 15 % para muestras y control externo de calibración, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. U.S. EPA. August 2016. Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

14.2. U.S. EPA. (2019). Recommended Human Health Recreational Ambient Water Quality Criteria or Swimming Advisories for Microcystins and Cylindrospermopsin. EPA 822-F-19-01.

7006UY

Determinación de microcistina Leucenina-Arginina (MC-LR) en aguas naturales por extracción en fase sólida (SPE) y determinación por cromatografía líquida con detección ultravioleta (UV)

Elaborado - N. Martin

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de la variedad microcistina Leucenina-Arginina (MC-LR) en aguas naturales bruta.

1.2. Los límites de detección y cuantificación de la metodología son: 0.3 µg/L y 1.3 µg/L, respectivamente.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos– Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Determinación de microcistinas totales en aguas naturales por ELISA (7005UY).

2.6. Instructivo de uso del Shimadzu HIC-20Asuper (INE 104).

2.7. Instructivos de uso de balanzas (INE 06, INE 115 y INE 94).

2.8. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.9. Instructivo para preparación de agua desionizada (INE 121, INE 122, INE 82, INE 110).

2.10. Instructivo de uso de la bomba de vacío Gast (INE 02).

2.11. Instructivo de uso de bloque calefactor para la concentración de muestras con corriente de nitrógeno (INE 127).

2.12. Instructivo de uso de baño con ultrasonido (INE 108).

2.13. Instructivo de uso de concentrador de muestras Labconco Rapidvap Vertex (INE 127).

2.14. Instructivo de uso de centrifuga Eppendorf 5810 (Rotor A-8-41) MB 609 (INE 124).

2.15. Rutas de análisis (RIN 49).

2.16. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA. (ES 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Las muestras de agua natural bruta son sometidas a tres ciclos de congelado (-20^{o}C) y descongelado para la liberación de MC-LR intracelular. El filtrado obtenido (250mL) es concentrado en microcistinas por SPE. El extracto de elución es evaporado por corriente de nitrógeno a 50^{o}C y restablecido para el análisis cromatográfico. En muestras correspondientes a la categoría de espumas de cianobacterias el filtrado obtenido se analiza tal cual o es diluido en caso de ser necesario previo al análisis cromatográfico. La cuantificación de MC-LR se efectúa por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) con gradiente lineal binario de solventes (Acetonitrilo 0.05% del ácido trifluoracético (TFA): Agua 0.05% TFA) y adquisición a 238nm. La identificación de MC-LR se realiza comparando el tiempo de retención en el cromatograma con el estándar inyectado en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requiere túnica, guantes y lentes de seguridad.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud; la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de MC-LR y produzca señal en el detector, será una interferencia.

5.2. Altas concentraciones de alguna interferencia cuyo tiempo de retención sea cercano al de MC-LR, la dilución de la muestra puede superar la interferencia.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno de alta densidad (PEHD) marrón de 1,0 L de capacidad dejando una cámara de aire de un cuarto el volumen del recipiente. La muestra no debe exceder los 10°C las primeras 48 horas desde el muestreo. Las muestras deben ser analizadas tan pronto como sea posible desde su recepción al laboratorio y no superar los 36 días desde el muestreo conservadas a ≤-20°C.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Recipiente de muestreo: Frasco de polietileno de alta densidad (PEHD) marrón de 1,0 L de capacidad.

7.2. Shott de 250mL.

7.3. Equipo para filtración a vacío de muestra: bomba de vacío, trampa de agua, campana de filtración y portafiltro.

7.4. Filtro de fibra de vidrio (0.7µm tamaño de poro y de 47mm de diámetro).

7.5. Papel pH de 0-14, con apreciación de una unidad de acidez.

7.6. Columnas de extracción fase sólida (SPE) C18 (Chrombond, 1g, tamaño de partícula de 0.45µm (Macherey, Nagel, (730015).

7.7. Soporte de SPE.

7.8. Equipo de extracción para SPE, Sep-Pack, marca Waters o similar, con cañerías y canillas de teflón.

7.9. Falcón de vidrio de 15mL.

7.10. Baño con ultrasonido.

7.11. Bloque calefactor para la concentración de muestras con nitrógeno.

7.12. Centrífuga de falcón de 15mL (≥2000g).

7.13. Balanza de resolución 0,0001g.

7.14. Balanza de resolución 0.001g.

7.15. Pipetas automáticas de volumen variable.

7.16. Probeta de 500mL.

7.17. Viales de vidrio ámbar de 4,0mL.

7.18. Equipo para filtración a vacío de fase móvil: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro.

7.19. Filtro de poliamida (0.45µm tamaño de poro y de 47mm de diámetro).

7.20. Schott de 1L.

7.21. Viales e insertos de vidrio (375µL) compatibles con inyector automático (SIL-10Ai).

7.22. Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Shimadzu HIC-20Asuper) compuesto por:

- Bomba para fase móvil (LC-20ADsp), y válvula (Shimadzu Low Pressure Gradient Unit CE Marked to be installed inside LC-20AD/20AT) para adaptación de bomba a la mezcla de dos canales.
- Desgasificador (DGU-20A)
- Horno para columna (CTO-20ACsp)
- Inyector automático con loop de 50 µL (SIL-10Ai)
- Detector ultravioleta (SPD-10AV)
- Dispositivo para comunicación (CBM-20A)
- Precolumna (RP-18 5µm, opcional) y columna C18 (250 mm × 4.6 mm, 5µm) LiChrosorb, Supleco.

8. REACTIVOS

8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).

8.2. Metanol calidad HPLC (MeOH) (Nro CAS 67-56-1).

8.3. Acetonitrilo calidad HPLC (ACN) (Nro CAS 75-05-8).

8.4. Ácido trifluoracético (TFA) (Nro CAS 76-05-1).

8.5. Solución de hidróxido de amonio (Nro CAS 1336-21-6) de 1mol/L.

8.6. Solución de TFA de 1mol/L.

8.7. Solución de dilución: Metanol (8.2) /Agua (8.1), 20/80.

8.8. Solución de enjuague: agua grado 1 (8.1), ajustada a pH 8 con solución de hidróxido de amonio (8.5).

8.9. Solución de elución de SPE: Metanol (8.2) /Agua (8.1), 90/10, ajustada a pH 3 con solución de TFA (8.6).

8.10. Nitrógeno (pureza 99,9%).

8.11. Fase móvil HPLC, Solución A: En un matraz erlenmeyer de 1L agregar 800mL de ACN (8.3), 500µL de TFA (8.4), agitar y llevar a volumen. Filtrar a vacío por filtro de poliamida (7.19). Trasvasar a schott de 1L y desgasear solución previo uso sonicado por 10 minutos a frecuencia normal.

8.12. Fase móvil HPLC, Solución B: En un matraz erlenmeyer de 1L agregar 800mL de Agua (8.1), 500µL de TFA (8.4), agitar y llevar a volumen. Filtrar a vacío por filtro de poliamida (7.19). Trasvasar a schott de 1L y desgasear solución previo uso sonicado por 10 minutos a frecuencia normal.

8.13. Solución estándar stock de microcistina Leucenina-Arginina (MC-LR) de 10mg/L.

8.14. Solución estándar para control de veracidad de la determinación de MC-LR de 10mg/L. Si es posible, utilizar un material de referencia certificado a frecuencia normal.

8.15. Soluciones estándares de calibración: pesar con una resolución de 0.1mg cada vial ámbar (7.16) y registrar su masa en RIN 49. A cada vial agregar el volumen de la solución de dilución (8.7) especificados en la Tabla 1, tarar la balanza y pipetear el volumen de solución estándar stock (8.12) especificado en la Tabla 1. Pesar con una resolución de 0.1mg la masa de estándar transferida y registrarla en RIN 49. Pesar la masa final del vial conteniendo la solución estándar de calibración, sonicar (20°C, frecuencia normal, 10 min) y preservar a -20°C.

Tabla 1. Esquema de volúmenes a pipetear para elaboración de soluciones estándares de calibración

Nº Solución estándar	Vol solución stock (8.12) (µL)	Vol solución dilución (8.5) (µL)	Concentración MC-LR, solución estándar (µg/L)
1	30	2970	100
2	60	2940	200
3	90	2910	300
4	150	2850	500
5	300	2700	1000

8.16. Solución de trabajo para el control de veracidad: pesar con una resolución de 0.1mg cada vial ámbar (7.16) y registrar su masa en RIN 49. Al vial agregar 2925µL solución de dilución (8.7), tarar la balanza y pipetear 75µL de solución estándar stock (8.13). Pesar con una resolución de 0.1mg la masa de estándar transferida y registrarla en RIN 49. Pesar la masa final del vial y preservar a -20°C.

Nota 1: Salvo que se especifique se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos que su contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables para el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Al someter la muestra a tres ciclos de congelado/descongelado, contemplar la expansión del volumen para evitar la fractura del recipiente de muestreo.

9.2. Minimizar la utilización de plásticos en las distintas etapas de la metodología analítica en cuanto sea posible, dada la pérdida de microcistinas por la adsorción a superficies plásticas (Para los congéneres con aminoácido arginina (como MC-LR) se reportan menores pérdidas).

9.3. Evitar la dilución de las soluciones estándares preservadas a -20°C por aguas de condensación. Dejar que alcance la temperatura ambiente previo a ser abiertos.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar por lo menos 5 soluciones estándares de calibración haciendo diluciones del estándar 8.13 en la solución de dilución (8.7), como se específica a modo de ejemplo en 8.15. Utilizar estándares de manera de abarcar las concentraciones de MC-LR esperadas para las muestras analizadas. Para aguas sin presencia de espumas el rango dinámico recomendado es 100-1000 µg/L.

10.2. Preparar una dilución del estándar 8.14 en la solución de dilución (8.7) a una concentración media del rango dinámico que abarque la curva de calibración, como se específica a modo de ejemplo en 8.16.

10.3. Evaluar la estabilidad de soluciones estándar al momento de análisis y/o preparar soluciones estándar nuevas según el control de la veracidad en la determinación.

10.4. Identificar en el cromatograma de cada estándar el pico correspondiente a MC-LR y realizar la gráfica de área del pico en función de la concentración en µg/L.

10.5. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras y al final de la corrida inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

El procesamiento de muestra se efectuará según la categoría a la que pertenezca la muestra.

Procesamiento de muestras sin floración y presencia de floración

Las muestras con un contenido inferior a 1 µg/L de microcistinas totales determinados según SOP 7005UY no serán analizadas.

Para las muestras con un contenido mayor a 1 µg/L de microcistinas totales determinados según SOP 7005UY pertenecientes a la categoría de sin floración (no se detectan visualmente colonias en el agua (valor guía de clorofila-a (2-10) µg/L)) y presencia de floración (se detectan visualmente colonias en el agua en baja concentración (valor guía de clorofila-a (10-500) µg/L), se procederá según se enlista a continuación:

11.1. Someter la muestra a tres ciclos de congelado (-20^{o}C), descongelado (temperatura ambiente) en el mismo recipiente de muestreo (7.1) para la liberación de microcistinas intracelulares.

11.2. Homogenizar la muestra manualmente.

11.3. Determinar el pH de la muestra (7.5) y corregir el mismo en caso que este fuera del rango de 5 a 8, con las soluciones de hidróxido de amonio (8.5) y TFA (8.6).

11.4. Filtrar a vacío (7.3) 225mL de muestra por filtro de fibra de vidrio (7.4) y recoger el filtrado en un Shott de 250mL (7.2) previamente pesado en balanza (7.14). Registrar la masa de la toma de muestra efectuada en RIN 49.

11.5. Agregar 25mL de metanol (8.2) al filtrado obtenido en 11.4.

11.6. Acondicionar las columnas SPE (7.6) cargando 5mL de MeOH (8.2), y luego 5mL de agua (8.1) a un flujo gravitacional. Asegurarse que una porción de solvente se mantiene en la cabeza de la columna.

11.7. Colocar las columnas previamente acondicionadas en el equipo de extracción, manteniendo las canillas de teflón cerradas.

11.8. Conectar la bomba de vacío al equipo de extracción intercalando en la cañería una trampa de seguridad para evitar el ingreso de muestra a la bomba.

11.9. Conectar la cañería de teflón a las columnas SPE teniendo la precaución de que estas contengan agua suficiente de modo que al comenzar el proceso de succión se cebe la cañería y no se seque la fase sólida. El extremo libre se coloca en el frasco que contiene la muestra; esta cañería debe quedar tocando el fondo del recipiente.

11.10. Encender la bomba de vacío y posteriormente abrir las canillas de las columnas de manera de lograr un goteo continuo de 1,7mL/min. Este es un factor fundamental para obtener buenas recuperaciones. Verificar la hermeticidad del sistema, marcado el nivel de la muestra en la columna y controlando que este no descienda en el tiempo.

11.11. Al culminar el pasaje de toda la muestra, enjuagar el frasco contenedor con 50mL de solución de enjugue (8.8) asegurando que toda la muestra ingrese a la columna SPE.

11.12. Con la misma configuración del equipo dejar pasar aire por la columna durante 30 minutos a -7 psi para el secado de la misma.

11.13. Colocar las columnas SPE secas en el soporte de elución (7.7) y agregar 5mL de solución de elución (8.9). En caso que se dificulte la elución por gravedad, se podrá facilitar la misma ejerciendo presión con una jeringa apropiada.

11.14. Recolectar el eluato en un falcón (7.9) previamente pesado en balanza (7.15).

11.15. Concentrar el eluato en baño seco a 50^{o}C bajo corriente de nitrógeno a 20 psi durante 30 minutos (volumen final aproximado 1.5mL).

11.16. Sonicar el eluato concentrado a 20^{o}C en frecuencia normal durante 10 minutos.

11.17. Registrar la masa final del eluato concentrado en RIN 49.

11.18. Centrifugar el falcón con el eluato concentrado a 1200g durante 10 minutos.

11.19. Transferir 300µL del sobrenadante a inserto de vidrio (7.21) e inyectar en HPLC.

Procesamiento de muestras espumas de cianobacterias

En muestras correspondientes a la categoría de espumas de cianobacterias (se detectan visualmente colonias en el agua en alta concentración (valor guía de clorofila-a >500 µg/L)) se procede según se específica a continuación:

11.20. Someter la muestra a tres ciclos de congelado (-20^{o}C), descongelado (temperatura ambiente) en el mismo recipiente de muestreo (7.1) para la liberación de microcistinas intracelulares.

11.21. Homogenizar la muestra.

11.22. Determinar el pH de la muestra (7.5) y corregir el mismo en caso que este fuera del rango de 5 a 8, con las soluciones de hidróxido de amonio (8.5) y TFA (8.6).

11.23. Filtrar a vacío (7.3) una fracción de muestra por filtro de fibra de vidrio (7.4).

11.24. El filtrado obtenido analizarlo tal cual o diluir en vial ámbar con solución de dilución (8.7). Registrar en RIN 49 las masas de: el vial vacío, la toma de muestra transferida y el vial conteniendo la solución diluida.

11.25. Centrifugar la dilución en falcón de vidrio (7.9) a 1200g durante 10 minutos.

11.26. Transferir 300µL del sobrenadante a inserto de vidrio (7.21) e inyectar en HPLC.

Análisis cromatográfico

11.27. Prender el HPLC Shimadzu HIC-20Asuper, según INE 104. Seleccionar el método MC_LR_gradiente ubicado en la siguiente ruta de archivo:

C:/LabSolutions/UV/ MC_LR_gradiente.lcm

11.28. Verificar que las condiciones operativas sean las descriptas a continuación:

- Temperatura del horno de columna: 40 °C.
- Longitud de onda de adquisición de datos: 238nm.
- Flujo de bombeo de fase móvil: 1 mL/min.
- El gradiente de fase móvil se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Variación de composición de fase móvil en el tiempo

Tiempo (min)	Solución A (8.11) (%)	Solución B (8.12) (%)
0	30	70
20	35	65
33	60	40
36	100	0
41	100	0
43	30	70
49	30	70

11.29. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 5000 µV/min y no posea un ruido superior a 50.00 µV. Estos parámetros se chequean desde el software con el test del "Baseline check". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 30 min.

11.30. Crear la secuencia de análisis según el instructivo de uso del equipo (INE 104), incluyendo los estándares, las muestras y los controles de calidad. Especificar un volumen de inyección de 20µL.

11.31. Si el área del analito está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.1. Si el área es mayor a la correspondiente al último punto de la curva de calibración proceder a diluir la muestra con agua 8.7 (registrar las diluciones realizadas en el RIN 49) o alternativamente realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.

11.32. Luego de finalizado el análisis apagar el cromatógrafo según el instructivo de uso del equipo (INE 104).

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Calcular las concentraciones exactas de las soluciones estándares de calibración (8.15) ($C_{Std.Cal}$) y de la solución de trabajo para el control de veracidad (8.16) en función de: la masa de la solución estándar stock (8.13) ($m_{Sol.Std.Stock}$), la densidad de la solución estándar stock (8.13) ($d_{Sol.Std.Stock}$), la concentración de la solución estándar stock (8.13) ($C_{Sol.Std.Stock}$), las masas del vial vacío (mvial.vacío) y conteniendo la solución (mvial.final) y la densidad de la solución de dilución (8.7) ($d_{Sol.Dil}$).

$$C_{Std.Cal}\,(\mu g/L) = \frac{(m_{Sol.Std.Stock}\,(g) \times C_{Sol.Std.Stock}\,(\mu g/L)) / d_{Sol.Std.Stock}\,(g/L)}{(m_{vial.final}\,(g) - m_{vial.vacío}\,(g)) / d_{Sol.Dil}\,(g/L)}$$

12.2. A partir de las distintas soluciones de estándares de calibración inyectadas se grafica su área en función de la concentración calculada. Para el rango de trabajo definido, se obtiene el mejor ajuste utilizando el modelo de regresión lineal simple (y=ax+b), donde "y" y "x" son el área y la concentración de las soluciones de calibración, respectivamente. Los parámetros de regresión del modelo son "a" y "b".

12.3. Calcular la concentración de MC-LR en el extracto (C_{Ext}) interpolando su área ($Á_{Mtra}$) en la curva de calibración correspondiente.

$$C_{Ext}\,(\mu g/L) = \frac{(Á_{Mtra} - b)}{a}$$

12.4. Calcular la concentración de MC-LR en la muestra (C_{Mtra}) en función de las masas de falcón vacío ($m_{falcón.vacío}$) y conteniendo el extracto concentrado ($m_{falcón.final}$), la concentración de MC-LR en el extracto (C_{Ext}), la densidad de la solución de elución (8.9) (dSol.eluc), las masas del schott vacío (mschott.vacío) y conteniendo la toma de muestra ($m_{schott.final}$), y la densidad de la muestra (d_{Mtra}).

$$C_{Mtra}\,(\mu g/L) = \frac{(m_{falcón.final}\,(g) - m_{falcón.vacío}\,(g)) \times C_{Ext}\,(\mu g/L)) / d_{Sol.eluc}\,(g/L)}{(m_{schott.final}\,(g) - m_{schott.vacío}\,(g)) / d_{Mtra}\,(g/L)}$$

12.5. Calcular la concentración de MC-LR en la espuma (C_{Esp}) en función de la masa de espuma transferida en la dilución (m_{Esp}), la densidad de espuma (d_{Esp}), la concentración de MC-LR determinada en la dilución (CDil), las masas del vial vacío ($m_{vial.vacío}$) y conteniendo la dilución ($m_{vial.final}$), y la densidad de la solución de dilución (8.7) ($d_{Sol.Dil}$).

$$C_{Esp}\,(\mu g/L) = \frac{(m_{Esp}\,(g) \times C_{Dil}\,(\mu g/L)) / d_{Esp}\,(g/L)}{(m_{vial.final}\,(g) - m_{vial.vacío}\,(g)) / d_{Sol.Dil}\,(g/L)}$$

12.6. Calcular la recuperación de la adición de la muestra fortificada (R) como la resta de la cantidad de MC-LR cuantificado en la muestra fortificada y sin fortificar sobre la cantidad de MC-LR adicionado. Para ello definimos a:

$C_{Mtra.F}$ Concentración de MC-LR en muestra fortificada.

$C_{Mtra.sF}$ Concentración de MC-LR en muestra sin forticar.

$m_{schott.vacío.F}$ $m_{schott.final.F}$ masa de schott vacío y conteniendo la toma de muestra fortificada, respectivamente.

$C_{Sol.Std.Fort}$ Concentración de MC-LR de solución estándar de fortificación.

$V_{sol.Std.Fort}$ Volumen de adición de solución estándar de fortificación.

$$R(\%) = \frac{[(m_{falcón.final.F}(g) - m_{falcón.vacio.F}(g)) \times C_{Mtra.F}(\mu g/L)) - (m_{falcón.final.sF}(g) - m_{falcón.vacio.sF}(g)) \times C_{Mtra.sF}(\mu g/L))] \times 10^5}{(V_{sol.Std.Fort}(\mu L) \times C_{Sol.Std.Fort}(\mu g/L))}$$

12.7. Si el área del pico cromatográfico de MC-LR en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.

12.8. Si el área del pico cromatográfico de MC-LR en la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación (referencia: "Manual de Control de Calidad Analítico", Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 2: Los valores de $d_{Sol.Std.Stock}$, $d_{Sol.Dil}$, d_{Mtra}, d_{Esp} y $d_{Sol.eluc}$ presentan los siguientes valores: 792g/L (MeOH 100%) ó 958g/L (MeOH 20%), 958g/L, 1000g/L, 1000g/L y 812g/L, respectivamente.

Nota 3: Cuando por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias.

Nota 4: Los datos de área y tiempo de retención se obtienen del reporte de la corrida generado en el software del equipo.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de calibración del método:** El coeficiente de correlación de la curva utilizada deberá ser R2 ≥ 0,995 y la regresión de los puntos de calibración en la curva deberá estar dentro del ± 10% del valor real de concentración del estándar.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), usando un estándar de concentración similar a la mitad del rango de la curva, preparado desde una fuente independiente a la utilizada para la construcción de la curva (RIN 49). Podrá utilizarse una solución de control interno o un material de referencia. La recuperación del valor de concentración real deberá estar dentro del ± 10 %, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.3. **Control de recuperación de la matriz fortificada:** Fortificar una de cada veinte muestras o por lo menos una por corrida analítica, con un volumen conocido de una solución estándar de manera que el agregado no aumente el volumen más del 5 % de la toma de muestra fortificada y de manera que la concentración final este dentro del rango de calibración del equipo de lo contrario diluir la muestra fortificada para llevarla al rango de calibración. Efectuar los tres ciclos de congelado y descongelado de la muestra, fortificar y procesar la muestra fortificada a través de toda la metodología (RIN 49). La recuperación del analito agregado deberá estar entre 75 - 125 % del valor agregado, en tanto no se establezcan los límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente.

13.4. **Control de la precisión:** Se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una de cada veinte muestras, o por lo menos un duplicado por corrida analítica. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un Rango Normalizado de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.

13.5. **Control de blancos:** la concentración de los analitos en la solución blanco deberá estar por debajo de la mitad del límite de reporte (siendo el límite de reporte el Límite de Detección/Cuantificación según el caso).

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Manuales del Cromatógrafo líquido, Shimadzu HIC20Asuper (1404 SHIc 05242-51).

14.2. International Organization for Standarization, 2005. ISO 20179: Water quality — Determination of microcystins — Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. Giberia:ISO.

14.3. World Health Organization. (2003). Guidelines for safe recreational water environments. Vol 1, Coastal and fresh waters. Geneva: WHO.

7007UY

Determinación de huevos de Helmintos en aguas residuales y lodos

Elaborado - G. Pistone

Modificado - R. Gálvez

Revisado - P. Simone, Jefe Depto. Análisis Físicoquímicos y Biológicos

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. A nivel mundial y en particular en los países en vías de desarrollo, las aguas residuales domésticas y lodos (residuos sólidos, semisólidos o líquidos provenientes del tratamiento de aguas residuales) constituyen una importante alternativa para su aprovechamiento y disposición como mejoradores de suelos y como fertilizantes, debido a su alto contenido de materia orgánica, nitrógeno y fósforo contribuyen a incrementar la productividad en las cosechas. Sin embargo, su reutilización también representa un foco de infección debido al alto contenido de patógenos que pueden tener, como son los helmintos.

1.2 Los helmintos son un amplio grupo de gusanos parásitos pluricelulares (de humanos, animales y vegetales) y de vida libre, con formas y tamaños variados. Sus ciclos vitales comprenden la producción de huevos o larvas, infecciosas o no, y la alternancia compleja de generaciones que incluye hasta tres huéspedes diferentes. Los helmintos dañan tejidos, causan efectos tóxicos y provocan pérdida de sangre. La contaminación por helmintos de cultivos puede llevarse a cabo a través de la deposición directa de heces tanto de humanos como de animales, o bien, a través del empleo de agua y lodos residuales para la agricultura. La infección por este tipo de patógeno intestinal ocurre cuando se ingieren los huevos en su etapa infectiva. Los huevos de helmintos constituyen un gran riesgo a la salud, ya que son altamente persistentes en el ambiente (pueden sobrevivir hasta incluso 6 años en lodo y suelo), poseen una dosis infectiva baja (de un huevo) y ausencia de inmunidad en los humanos. Además, son resistentes a los tratamientos convencionales de desinfección, razón por la cual en muchos países se utilizan como organismos indicadores para el monitoreo de la eficiencia de diversos procesos de tratamiento o desinfección.

1.3 Los helmintos se encuentran divididos en tres grandes grupos, los Plathelmintos (o cestodos y trematodos), los Nemathelmintos (o nematodos) y los Aschelmintos. En el caso de aguas residuales y lodos, solamente los dos primeros son de importancia. Los Plathelmintos son gusanos acintados o planos, mientras que los Nemalthelmintos son gusanos de forma cilíndrica no segmentados. Dentro de los Cestodos se encuentran los géneros Hymenolepis nana, Hymenolepis diminuta, Taenia saginata, y Taenia solium, en el caso de los Trematodos los géneros Schistosoma spp. y Fasciola hepatica, mientras que los géneros Trichuris trichiura, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Strongyloides stercoralis, Enterobius vermicularis, Trichosomoides spp. Toxocara canis, Toxocara catis y Ascaris lumbricoides pertenecen a los Nematodos (Theis et al., 1978).

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Procedimiento: “Determinación de humedad en muestras sólidas (residuos sólidos industriales, sedimentos, suelos)”. Método termogravimétrico. (1050 UY).

2.6. Instructivo de uso de equipo bomba de vacío (INE 02).

2.7. Instructivos de uso de equipo autoclaves verticales (INE 97, INE 155).

2.8. Instructivo de uso de equipo balanza (INE 16C).

2.9. Instructivo de equipo desionizador (INE 121).

2.10. Instructivo de uso de centrifuga (INE 124).

2.11. Rutas de análisis (RMB15).

2.12. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El presente método describe la detección, identificación y cuantificación de huevos de helmintos totales y viables en agua residual y lodo.

3.2 La prueba se basa en la diferencia de densidades entre los huevos de helmintos y otros sólidos presentes en las aguas residuales y/o lodos. Comprende tres procesos fundamentales de separación que son la sedimentación, la flotación y la decantación, y una etapa de extracción denominada bifásica. Por último, una fase de identificación y conteo que se lleva a cabo utilizando una cámara de conteo Sedwick-Rafter o un Disco de Doncaster. En el Diagrama 1 se muestran los pasos de la técnica para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos en agua y lodos.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. El analista debe utilizar equipo de seguridad apropiado (guantes descartables, túnica y mascarilla) para evitar cualquier riesgo de infección.

5. INTERFERENCIAS

5.1. No aplica.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Muestras líquidas: la muestra debe ser colectada en bidones de plástico, de paredes lisas de 7L de capacidad, se toman muestras de 5L (volumen total). Mantener la muestra a una temperatura menor a 6ºC hasta su llegada al laboratorio. Mantener en refrigeración hasta su análisis. Si no es posible mantenerla en refrigeración, debe fijarse con 10mL de formaldehído al 4 %. Los huevos de helmintos se mantienen viables por años.

6.2 Muestras de lodos: tomar aproximadamente 500g de muestra en bolsa de nylon. Mantener en refrigeración hasta su análisis.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1 Destilador o desionizador de agua

7.2 Heladera

7.3 Autoclave

7.4 Centrífuga con capacidad para operar en el rango 600 – 800 x g (equivale a 1727 – 1994 rpm en modelo de centrífuga 5810 Eppendorf AG)

7.5 Microscopio óptico equipado con iluminación Kohler, campo claro.

7.6 Balanza de resolución 0,01 g

7.7 Campana de extracción de gases

7.8 Equipo de filtración compuesto por: bomba de vacío, kitasato de 1000mL o mayor volumen, y manguera de conexión.

7.9 Densímetro (hidrómetro) con intervalo de medición de 1.0 a 1.4 ±0.01 g/cm^3

7.10 Recipientes de plástico de paredes lisas de 2 o 3L de capacidad

7.11 Tamiz de 150-170 µm (micras) de tamaño de poro, con embudo plástico con diámetro adaptable al tamiz (el tamaño de los huevos es alrededor de 80 µm).

7.12 Tamiz de 20 µm (micras) de tamaño de poro, con embudo plástico para dicho tamiz (opcional)

7.13 Cámara de Sedgwick-Rafter o Disco Doncaster

7.14 Tubos de centrífuga cónicos de plástico, de 50mL y 200mL (o de mayor capacidad)

7.15 Matraz aforado de 1000mL

7.16 Probetas graduadas de 10 mL, 50 mL, 100 mL y 1.000mL.

7.17 Parrilla con agitación magnética

7.18 Piseta de plástico

8. REACTIVOS

8.1. Agua destilada o desionizada (según ES 01).

8.2 Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$) o en su defecto Sulfato de magnesio ($MgSO_4$).

Solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) con gravedad específica de 1.3. Disolver 800 g de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$; Nº CAS 7446-20-0) en 1000 mL de agua destilada, mezclar en la parrilla magnética hasta homogeneizar totalmente. Medir la densidad con el densímetro y, ajustar la densidad a 1.3, agregando sulfato de zinc o agua destilada, según se requiera. Almacenar en recipiente hermético y verificar densidad mensualmente. En caso de utilizar sulfato de magnesio, pesar 215.2 g y disolver en 1000 mL de agua destilada (es importante mencionar que la gravedad máxima obtenida con este reactivo es de 1.20). Almacenar en recipientes herméticos, a temperatura ambiente y fuera de la luz.

8.3 Formaldehído al 4% (Nº CAS 50-00-0).

8.4 Acetato de etilo ($C_2H_5OCOOCH_3$; Nº CAS 141-78-6) - Opcional.

8.5 Ácido sulfúrico 0.1 N (H_2SO_4) y alcohol etílico (C_2H_5OH) - Opcional.

Solución ácido-alcohol. Homogeneizar 650 mL de ácido sulfúrico 0.1 N con 350 mL de alcohol etílico y almacenar en un recipiente hermético. Guardar a temperatura ambiente y fuera de la luz.

8.6 **Tween 80 (Nº CAS 9005-65-6) al 0.01 %** - Opcional. Añadir 1 mL del reactivo en 999mL de agua destilada y homogeneizar en parrilla de agitación hasta su completa disolución. Almacenar en recipiente hermético durante 2 a 3 meses a temperatura ambiente.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1 Cuando se efectúe la agitación de las soluciones con acetato de etilo, ésta se debe realizar dentro de campana de extracción; considerar su inflamabilidad. Evitar el contacto con los ojos, piel o ropa, ya que es un reactivo sumamente tóxico.

9.2 Se debe lavar y desinfectar el área de trabajo, así como el material utilizado por el analista, antes y después del ensayo. Al finalizar, enjuagar dentro del sector todo el material utilizado con agua de la canilla caliente (a más de 60ºC), previo a su desinfección en autoclave, para evitar el riesgo de infección.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1 Pre-tratamiento de la muestra

En el caso de lodos:

- Antes de procesar la muestra determinar el contenido de sólidos totales (ST) en % o % de Humedad, para posteriormente tomar el peso fresco que corresponda a 2 gr de ST.

% de sólidos totales (ST)= 100% -% de humedad

- Homogeneizar durante 2 minutos la cantidad de lodo que corresponda a 2gr de ST, utilizando para ello de forma opcional, 200mL de una solución de Tween 80 al 0.01% (a tales efectos se puede utilizar un agitador orbital a 200rpm). También se puede realizar este procedimiento con agua destilada o desionizada
- Llevar a 1L con agua destilada o desionizada.
- Sedimentar la muestra al menos durante 3 horas, de preferencia toda la noche. No mover las muestras durante el proceso de sedimentación.

En el caso de aguas residuales:

- Sedimentar 5 L de muestra al menos durante 3 horas, de preferencia toda la noche.

Etapa 1

11.2 Aspirar el sobrenadante sobre la superficie dejando unos centímetros de agua por encima del sedimento; no sumergir la punta de la pipeta más de 1 cm del nivel del líquido durante esta operación.

11.3 Filtrar el sedimento en tamiz de 150-170 µm.

11.4 Enjuagar el recipiente original con agua de la canilla y pasar el enjuague a través del tamiz (es importante que no queden restos de sólidos en las paredes del recipiente), seguir enjuagando hasta 5 L (en el caso de lodos enjuagar tamiz y recipiente con 1-2L de agua de la canilla).

11.5 Sedimentar toda la noche, o al menos 3 horas.

Etapa 2

11.6 Aspirar el sobrenadante sobre la superficie dejando unos centímetros de agua por encima del sedimento; no sumergir la punta de la pipeta más de 1 cm durante esta operación. Transferir el sedimento a tubos para centrifugar y realizar enjuagues al recipiente que contiene la muestra con agua destilada o desionizada.

11.7 Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min (de modo de lograr una buena separación del sedimento, y obtener una **pastilla (pellet)** que sea fácilmente re suspendido). Aspirar el sobrenadante de los tubos y juntar las pastillas en 1 tubo. Realizar enjuagues a los demás tubos que contenían las pastillas con agua destilada o desionizada y transferir estos al tubo que contiene la pastilla.

11.8 Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min. Aspirar lo más posible el sobrenadante y resuspender la pastilla con un volumen suficiente de solución de $ZnSO_4$, densidad=1.3 (en este paso los huevos de helmintos presentes en la muestra, al ser menos densos flotan y quedan retenidos en la solución de $ZnSO_4$).

11.9 Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min. Recuperar el sobrenadante en un recipiente de 2L y agregar 1 L de agua destilada o desionizada. Sedimentar toda la noche, o al menos 3 horas.

Etapa 3

11.10 Aspirar el sobrenadante sobre la superficie, no sumergir la punta de la pipeta más de 1 cm durante esta operación, dejando aproximadamente 300 mL arriba del sedimento. Transferir a tubos de centrífuga. Realizar enjuague al recipiente que contenía la muestra y tratarlo como al sedimento.

11.11 Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min. Aspirar el sobrenadante y juntar las pastillas en un solo tubo, realice enjuague a los demás tubos que contenían las pastillas y deposítelo en el tubo de la pastilla. Si la muestra continúa siendo muy turbia continuar con 11.12. De lo contrario continuar con 11.13.

11.12 Opcional: Para eliminar interferencias en muestras muy turbias: Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min. y aspirar el sobrenadante. Agregar 15 mL de la solución ácido-alcohol y 10 mL de acetato de etilo (solvente poco denso), y re suspender la pastilla utilizando vortex. Realizar todo este proceso bajo campana de extracción (en este paso, las partículas menos densas que los huevos quedan en el acetato de etilo y los huevos quedan en la solución ácido-alcohol).

Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min y aspirar el sobrenadante.

Agregar 5 mL aprox. de agua destilada o desionizada y resuspender la pastilla, llevar con agua hasta 50 mL.

Volver a centrifugar a 600-800 x g/ 5 min. y aspirar el sobrenadante.

11.13 En caso de contar con tamiz de 20 µm de poro se recomienda efectuar un segundo filtrado, cuya finalidad es remover el detritus de menor tamaño y facilitar la lectura de los huevos de helmintos en el sedimento final al microscopio. Para ello, filtrar la muestra y recuperar la película que ha quedado retenida sobre la malla con el volumen de agua destilada o desionizada que sea necesario (utilizar piseta), en un tubo de 200 mL de centrífuga, desechar filtrado (también este lavado permite retirar los restos de la solución de acetato de etilo, si se efectúo ese paso, ya que resulta tóxico para los huevos de helmintos).

11.14 Centrifugar a 600-800 x g/ 5 min. y aspirar el sobrenadante.

11.15 Homogeneizar el sedimento y transferir a un Disco Doncaster o una Cámara de conteo Sedgwick-Rafter.

11.16 Observar la muestra en microscopio, identificar y cuantificar todos los huevos de helmintos presentes. Tomar nota de los diferentes géneros y número de cada uno.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Reportar el número de huevos de helmintos por L en el caso de aguas residuales (HH/L), y número de huevos de helmintos por g de ST en el caso de lodos (HH/gST).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. No aplica.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1 Técnicas para determinar Huevos de Helmintos en agua residual y lodos. Instituto de Ingeniería, UNAM. México. Adaptada de Norma Mexicana NMX-AA-113-SCFI-2012 “Análisis de agua- medición del número de huevos de helmintos en aguas residuales y residuales tratadas por observación microscópica”.

7008UY

Determinación de cianotoxinas en aguas naturales por inyección directa utilizando Cromatografía Líquida acoplada a detector de masas en tándem

Elaborado - N. Barboza

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cuatro cianotoxinas en aguas naturales, en los siguientes rangos de trabajo:

Tabla 1: Lista de cianotoxinas incluidas en este procedimiento, incluyendo rango de trabajo y Límite de cuantificación.

Name	Nombre	Nº CAS	Límite de cuantificación (µg/L)	Rango de trabajo (µg/L)
Microcystin-LR	Microcistina LR	101043-37-2	0,5	0,5-10
Nodularin	Nodularina	118399-22-7	0,5	0,5-10
Cylindrospermopsin	Cilindrospermopsina	143545-90-8	0,2	0,2-10
Saxitoxin	Saxitoxina	35554-08-6	0,2	0,2-10

*El rango de trabajo queda determinado, en el extremo inferior por el límite de cuantificación del método y en el límite superior, por el nivel más alto de concentración del rango lineal. El límite superior puede ser extendido siempre que la muestra sea diluida y el área correspondiente a la señal de esta pueda ser interpolada en la curva.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del Cromatógrafo Liquido con detector de masas tándem triple cuadrupolo Shimadzu 8050 UHPLC-MS/MS (INE 139).
2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE07, INE 115)
2.7. Ruta de análisis de cianotoxinas en aguas naturales por inyección directa LC MS/MS (RIN 60)
2.8. Ruta de de preparación de Mixes de cianotoxinas (RIN 59).
2.9. Registro de masa de SOLUCIONES MADRE Y MIXES (RIN 51).
2.10. Instructivo de uso de desionizador y purificador de agua Millipore Elix Essential (INE 121, INE 122)
2.11. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108, INE 134)
2.12. Instructivo de uso de mufla (INE 27).
2.13. Instructivo de uso de vórtex (INE 126).
2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01)
2.15. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Las muestras de agua naturales son sometidas a tres ciclos de congelado/descongelado para la liberación de toxinas intracelulares. Posteriormente, se realiza la homogeneización y filtrado para el posterior análisis de cianotoxinas totales.
3.2. Los analítos de la Tabla 1 se determinan por cromatografía liquida acoplada a detector de masas en tándem mediante inyección directa.
3.3. La cuantificación de cada cianotoxina se realiza por interpolación del área de la señal de la transición de mayor intensidad en la muestra, en la curva de calibración correspondiente o por comparación con un punto de ésta, siempre que la diferencia de áreas no sea mayor al 30 %.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. En caso de ser necesario, la manipulación debe realizarse en campana de extracción.

5. INTERFERENCIAS

5.1. En caso de presentarse una interferencia por parte de la matriz, que coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (de cuantificación o confirmación) se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación.

5.2. Las interferencias que son producto de la matriz, pueden repercutir en la recuperación de los analítos. Este efecto puede ser compensado por el uso de curvas de calibración en matriz.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en una botella de 0.5 L de vidrio ámbar, previamente enjuagada con hexano y acetona. La tapa debe incluir una contratapa de teflón o papel aluminio.

6.2. Las muestras deben ser analizadas tan pronto como sea posible desde su recepción al laboratorio. (Congelar las muestras a -20°C antes de las 24hs luego de la recolección).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo UHPLC-MS/MS SHIMADZU 8050. En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares que permita las prestaciones definidas en este documento. (IN647, IN648).

7.2. Columna cromatográfica: Raptor ARC-18, C-18, 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm o similar.

7.3. Generador de Nitrógeno, Peak Genius 10 Series-1051 o similar (IN 651)

7.4. Balanza de resolución 0,00001 g (IN 19) y 0,001 g (IN 20, IN 594)

7.5. Mufla (FQ 146).

7.6. Vórtex (IN 615, IN 717).

7.7. Baño de agua con ultrasonido (IN 554, IN 614).

7.8. Freezer (IN 386, PM 446)

7.9. Viales de vidrio de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.

7.10. Jeringa de vidrio de 1 a 5 mL.

7.11. Filtros de PVDF o PFTE con tamaño de poro 0,22 µm.

7.12. Pipetas automáticas regulable de 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

7.13. Tips para pipetas automáticas 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

7.14. Tubos eppendorf de 1,5 o 2 mL.

7.15. Papel pH de 0-14, con apreciación de una unidad de pH.

8. REACTIVOS

8.1. Hexano $CH_3(CH_2)_4CH_3$ Nro. CAS 110-54-3

8.2. Acetona para análisis $(CH_3)_2CO$ Nro. CAS 67-64-1

8.3. Metanol calidad HPLC Nro. CAS 67-56-1

8.4. Agua desionizada (grado 1, según ISO 3696 en su versión vigente)

8.5. Formiato de amonio (HCO_2NH_4) Nro. CAS 540-69-2

8.6. Ácido acético (CH_3CO_2H) Nro. CAS 64-19-7

8.7. Acido fórmico (HCOOH) Nro CAS 64-18-6

8.8. Buffer FF (Formiato-fórmico): 5mM Formiato de amonio (8.5) 3.6 mM ácido fórmico (8.7) pH=3.7

8.9. Solución Buffer FF (8.8):Metanol (8.3) 80:20

8.10. Solución de ácido acético 0.1 M

8.11. Material de referencia certificado correspondiente a cada cianotoxina (CT) listados en la Tabla 1 del presente documento. Puede tratarse del sólido liofilizado para su reconstitución o una solución estándar para cada cianotoxina (concentración aproximada 10 mg/L).

8.12. Solución stock mix de cianotoxinas: Microcistina-LR, Cilindrospermopsina y Nodularina (concentración aproximada de cada toxina 1 mg/L) a partir de 8.11 en una solución de agua:metanol 97:3. Estable por tres meses.

8.13. Solución stock de saxitoxina (concentración aproximada 1 mg/L) en ácido acético 0.1 M. Estable por tres meses.

8.14. Solución de fortificación de cianotoxinas (concentración aproximada de cada cianotoxina 100 µg/L), preparada a partir de 8.12 y 8.13 en 8.9. Estable una semana.

8.15. Nitrógeno (pureza 99,9 %)

8.16. Argón alta pureza (99,998 o 4.8)

8.17. Detergente no alcalino para limpieza (Extran)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.

9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, debe ser lavado con agua y Extran, y enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona. Evaluar la necesidad de muflar el material de vidrio previo a su uso.

9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con cianotoxinas, deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

9.4. Minimizar la utilización de material de plásticos en las distintas etapas del análisis, dada la posibilidad de pérdida de toxinas por la adsorción a las superficies.

9.5. Al someter la muestra a tres ciclos de congelado/descongelado, contemplar la expansión del líquido, para evitar la fractura del recipiente de muestreo.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Para preparar las curvas de calibración en matriz (Tabla 2), se realiza el procedimiento de preparación de muestra utilizando agua bruta libre de los analítos de interés y se agrega la cantidad apropiada de un mix de cianotoxinas (8.14) o diluciones del mismo en concentraciones crecientes de acuerdo con los rangos de trabajo establecidos en la Tabla 1 y de manera que el punto más bajo de la curva de calibración, corresponda al límite de reporte y/o límite de cuantificación. La curva de Matrix Match debe contener como mínimo 3 niveles de concentración. De igual manera preparar un cero de curva, a partir de la muestra blanco y agua desionizada. En caso de que la matriz empleada para realizar la calibración contenga los analítos de interés, se deberán cuantificar las muestras empleando el método de adiciones estándar.

Tabla 2. Esquema de preparación de curva de calibración Matrix Match.

Nivel de concentración (µg/L)	Volumen de muestra (µL)	Concentración Mix CT (µg/L)	Volumen de Mix CT (µL)	Volumen de ácido acético 0.1 M (µL)	Volumen de buffer FF: MeOH 80:20 (µL)(8.9)
0.1	400	1	50	10	40
0.2	400	5	20	10	70
0.5	400	10	25	10	65
1	400	10	50	10	40
5	400	100	25	10	65
10	400	100	50	10	40

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra

11.1. Someter la muestra a tres ciclos de congelado (-20 °C), descongelado (temperatura ambiente o baño) para la liberación de toxinas intracelulares.

11.2. Homogeneizar la muestra.

11.3. Tomar 400 µL de muestra en un tubo eppendorf, adicionar 10 µL de ácido acético (8.10) y 90 µL de solución 8.9.

11.4. Seguidamente se agita en vórtex durante 30 segundos, se coloca en baño de ultrasonido 1 minuto y se filtra mediante filtro de 0,22 µm y jeringa a un vial de 2 mL.

11.5. Inyectar en el Cromatógrafo. La secuencia de inyección deberá estar diseñada de la siguiente manera: al menos un estándar preparado en solvente, curva de calibración en Matriz, muestras, duplicados, muestras fortificadas de controles de calidad y nuevamente la curva de calibración en matriz.

Análisis cromatográfico

11.6. Prender el cromatógrafo SHIMADZU 8050 UHPLC-MS/MS. Seleccionar el método correspondiente y verificar que las condiciones sean las descriptas a continuación:

Fase móvil: (Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Flujo: 0,4 mL /min Sistema desgasificador. Canal A: Buffer FF (8.8) Canal B: Metanol (8.3)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	97	3
	0.5	50	50
Tiempo de corrida: 13 minutos	2.5	45	55
	5.5	25	75
	7.5	15	85
	9.0	15	85
	9.01	97	3
	13	97	3
Inyección:	Volumen inyección del método: 5 µL		
Columna:	Raptor ARC-18, 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm. Temperatura: 35 °C.		
Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI (modo positivo) Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C. Heat Block Temperature: 400 °C.		

*Parámetros del detector MS/MS para cada cianotoxina a ser determinado. Ver tabla 2.

Tabla 3. Parámetros del detector MS/MS

Cianotoxina	Tiempo de retención (min)	Ión precursor (m/z)	Ión cuantificación (m/z)	Iones referencia (m/z)	Q1 (V)	CE (eV)	q3 (V)
Microcistina LR (Mic-LR)	5,0	498,5	135,2			-15,9	-25
				103,0	-26	-47,5	-33
Cilindrospermopsina (CYL)	1,2	415,8	194,2		-20	-35,8	-38
				336,2	-12	-24,2	-22
				176,2	-20	-35,8	-36
Nodularina (NOD)	4,5	825,5	135,2		-20	-55	-12
				781,4	-20	-35,8	-20
				389,3	-20	-41,2	-12
Saxitoxina (STX)	0,5	300,1	204,1		-20	-18,3	-28
				282,1	-20	-24,9	-20

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada cianotoxina, el área del pico correspondiente a la transición de cuantificación en función de la concentración. Para el rango lineal definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde “y” es el área de la cianotoxina y “x” la concentración de dicha cianotoxina en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se evalúa la linealidad de la curva de calibración de cada cianotoxina, a partir del cálculo de residuales. Se considera un ajuste adecuado, si se obtienen valores de residuales menores al 20 %. La relación entre curvas inyectadas al inicio del batch y al final de mismo (bracketing calibration) no debe de superar una diferencia de 30%.

12.3. Se comparan las señales de la muestra extraídas y de los estándares, para identificar los compuestos analizados. Los tiempos de retención para los analitos en las muestras, deben coincidir con el promedio de los tiempos de retención en los estándares de calibración, dentro de una tolerancia de ± 0.1 minutos. Se selecciona la transición de cuantificación (la más intensa) y una transición de confirmación, y se establece la relación entre las intensidades de estos iones, expresada como razón relativa al ion más intenso (ratio). Para las muestras extraídas, esta relación entre iones debe ser ± 30% de la calculada como promedio en los estándares de calibración utilizados.

12.4. La concentración de cada cianotoxina en la dilución de la muestra se calcula interpolando su área, en la curva de calibración correspondiente:

$$C_{\text{muestra dil i}}\,(\mu g/L) = \frac{(\text{Área cianotoxina i}) - b}{a}$$

Siendo “a” la pendiente y “b” la ordenada en el origen de la curva de calibración.

12.5. Es posible realizar una cuantificación utilizando un solo nivel de calibración siempre y cuando el área del analito en la muestra y en el estándar sean similares (dentro de ± 30 %).

12.6. La concentración de cada toxina en la muestra, en µg/L, se calcula según (ajuste por el paso de dilución en la preparación):

$$C_{\text{cianotoxina i, muestra}}\ (\mu g/L) = \frac{C_{\text{i, muestra dil}} \times 500}{400}$$

12.7. Se asume que la densidad de las muestras es siempre 1 g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza un blanco de matriz, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que los cromatogramas no contengan señales que interfieran con los compuestos de interés. Además, se verificará que el solvente utilizado para la reconstitución final de las muestras no presente contaminantes que interfieran en la determinación.

13.2. **Control de recuperación de fortificaciones:** Se evalúa la recuperación de todos los analítos de interés, realizando el análisis de un fortificado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch. Para ello, fortificar una muestra con la solución 8.14 de tal forma que la concentración final corresponda a aproximadamente el límite de cuantificación. La recuperación de la adición debe estar dentro del rango 60-140 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos. En caso de no cumplimiento, evaluar la posibilidad de informar utilizando límites de reporte, repetir la determinación o el análisis completo.

La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{toxina i}} = \frac{((C_{\text{toxina i, muestra fortificada}} * \text{Vol}_{\text{final muestra fortificada}}) - (C_{\text{toxina i, muestra}} * \text{Vol}_{\text{muestra}}))}{(C_{\text{toxina i estándar fortificación}} * \text{Vol}_{\text{estándar fortificación}})}$$

donde:

Ctoxina i, muestra fortificada: Concentración de la toxina i calculada según 12.6, en la muestra fortificada en µg/L

Ctoxina i, muestra: Concentración de la toxina i en la muestra sin fortificar (blanco), calculada según 12.6, en µg/L

Ctoxina i estándar fortificación: Concentración del estándar utilizado para la fortificación, en µg/L

Vol final muestra fortificada: Volumen final de muestra fortificada, en mL.

Vol muestra: Volumen de muestra sin fortificar utilizado en la fortificación.

Vol estándar fortificación: Volumen de estándar agregado a la muestra fortificada

13.3. **Control de veracidad de la determinación:** En caso de ser posible, evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), utilizando un material de referencia certificado. Dicho control se prepara en forma análoga a los puntos de curva en matriz y a una concentración incluida dentro del rango de calibración. De ser posible, el material de referencia deberá incluir la totalidad de las cianotoxinas a analizar. La concentración obtenida para cada cianotoxina debe estar en el rango 60-140 % o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento analítico y evaluar la repetición del análisis del batch.

13.4. **Control continuo de calibración del equipo:** El control de calibración es utilizado para poder identificar posibles cambios de sensibilidad durante la determinación analítica. Para ello se incluye un punto de curva de concentración intermedia cada 10 inyecciones y al final de la secuencia como mínimo 3 puntos de curva. Se acepta hasta un 30 % de variación de la sensibilidad. Si se obtiene una diferencia de señal mayor al 30 % respecto a la primera inyección del estándar, evaluar la repetición parcial o total del análisis cromatográfico.

13.5. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch de muestras. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 20 %, para cada cianotoxina.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA document EPA/600/R-17/344. Single Laboratory Validated Method for Determination of Microcystins and Nodularin in Ambient Freshwaters by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). 2017

14.2. EPA document EPA/600/R-17/130. Single Laboratory Validated Method for Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Ambient Freshwaters by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). 2017

14.3. EPA Method 545, R-15/009, Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). 2015.

14.4. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, First Edition.2017

14.5. SANTE 11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2021.

7009UY

Determinación de cianotoxinas en aguas naturales liofilizadas por Cromatografía Líquida acoplada a detector de masas en tándem

Elaborado - V. Croce, V. Muñoz

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de cuatro cianotoxinas en aguas naturales, en los siguientes rangos de trabajo:

Tabla 1: Lista de cianotoxinas incluidos en este procedimiento

Name	Nombre	Nº CAS	Límite de cuantificación (µg/L)	Rango de trabajo (µg/L)
Microcystin-LR	Microcistina LR	101043-37-2	0,01	0,01-10
Nodularin	Nodularina	118399-22-7	0,01	0,01-10
Cylindrospermopsin	Cilindrospermopsina	143545-90-8	0,01	0,01-10

*El rango de trabajo queda determinado, en el extremo inferior por el límite de cuantificación del método y en el límite superior, por el nivel más alto de concentración del rango lineal.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del Cromatógrafo Liquido con detector de masas tándem triple cuadrupolo Shimadzu 8050 UHPLC-MS/MS (INE 139).
2.6. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE07, INE 115)
2.7. Ruta de análisis de cianotoxinas en aguas naturales por liofilizado LC MS/MS (RIN 61)
2.8. Ruta de de preparación de Mixes de cianotoxinas (RIN 59).
2.9. Registro de masa de SOLUCIONES MADRE Y MIXES (RIN 51).
2.10. Instructivo de uso de desionizador y purificador de agua Millipore Elix Esentials (INE 121, INE 122)
2.11. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108, INE 134)
2.12. Instructivo de uso de mufla (INE 27).
2.13. Instructivo de uso de vórtex (INE 126).
2.14. Instructivo de uso del liofilizador (INE 131)
2.15. Instructivo de uso de la centrífuga (INE 124)
2.16. Instructivo de uso del concentrador de muestras RapidVap (INE 127)
2.17. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01)
2.18. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Las muestras de agua naturales son sometidas a tres ciclos de congelado/descongelado para la liberación de toxinas intracelulares. Posteriormente, se homogeniza y se realiza una toma en un recipiente adecuado para su liofilización.
3.2. El extracto obtenido en el liofilizado se retoma cuantitativamente en un volumen adecuado, se centrifuga y concentra por corriente de nitrógeno. Finalmente el contenido se retoma en un volumen adecuado y se filtra para su posterior análisis.
3.3. Los analítos de la Tabla 1 se determinan por cromatografía liquida acoplada a detector de masas en tándem (LC-MSMS).
3.4. La cuantificación de cada cianotoxina se realiza por interpolación del área de la señal de la transición de mayor intensidad de la muestra, en la curva de calibración correspondiente o por comparación con un punto de esta, siempre que la diferencia de áreas no sea mayor al 30 %.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. En caso de presentarse una interferencia por parte de la matriz, que coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (de cuantificación o confirmación) se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación.

5.2. Las interferencias que son producto de la matriz, pueden repercutir en la recuperación de los analítos. Este efecto puede ser compensado por el uso de curvas de calibración en matriz.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en una botella de 0.5 L de vidrio ámbar, previamente enjuagada con hexano y acetona. La tapa debe incluir una contratapa de teflón o papel aluminio.

6.2. Las muestras deben ser congeladas a -20 °C en las primeras 24 horas posteriores al muestreo y se debe realizar la etapa de concentración antes de los 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo liquido UHPLC-MS/MS SHIMADZU 8050. En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares que permita las prestaciones definidas en este documento. (IN 647, IN 648).

7.2. Columna cromatográfica: Raptor ARC-18, C-18, 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm o similar.

7.3. Generador de Nitrógeno, Peak Genius 10 Series-1051 o similar (IN 651)

7.4. Balanza de resolución 0,00001 g (IN 19) y 0,001 g (IN 20, IN 594)

7.5. Mufla (FQ 146).

7.6. Vórtex (IN 615, IN 717).

7.7. Baño de agua con ultrasonido (IN 554, IN 614).

7.8. Freezer (IN 386, PM 446)

7.9. Viales de vidrio de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.

7.10. Jeringa de vidrio de 1 a 5 mL.

7.11. Filtros de PVDF o PFTE con tamaño de poro 0,22 µm.

7.12. Pipetas automáticas regulables de 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

7.13. Tips para pipetas automáticas 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

7.14. Tubos Eppendorf de 1,5 o 2 mL.

7.15. Papel pH de 0-14, con apreciación de una unidad de pH.

7.16. Liofilizador (IN 628).

7.17. Centrífuga con adaptadores para tubos de 10 mL (MB 609).

7.18. Concentrador de muestras RapidVap Vertex (IN 610).

7.19. Tubos de vidrio con tapa de teflón aptos para centrífuga.

7.20. Tubos de vidrio aptos para RapidVap.

7.21. Pipetas Pasteur de vidrio.

7.22. Frascos Schott de 250 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Hexano $CH_3(CH_2)_4CH_3$ Nro. CAS 110-54-3

8.2. Acetona para análisis $(CH_3)_2CO$ Nro. CAS 67-64-1

8.3. Metanol calidad HPLC Nro. CAS 67-56-1

8.4. Agua desionizada (grado 1, según ISO 3696 en su versión vigente)

8.5. Formiato de amonio (HCO_2NH_4) Nro. CAS 540-69-2

8.6. Ácido acético (CH_3CO_2H) Nro. CAS 64-19-7

8.7. Acido fórmico (HCOOH) Nro CAS 64-18-6

8.8. Buffer FF (Formiato-fórmico): 5mM Formiato de amonio (8.5) 3.6 mM ácido fórmico (8.7) pH=3.7

8.9. Solución Buffer FF (8.8):Metanol (8.3) 80:20

8.10. Solución de ácido acético 0,1%

8.11. Solución de ácido acético 0,1% (8.10):Metanol (8.3) en relación 25:75 (pH 4-5)

8.12. Material de referencia certificado correspondiente a cada cianotoxina listados en la Tabla 1 del presente documento. Puede tratarse del sólido liofilizado para su reconstitución o una solución estándar para cada cianotoxina (concentración aproximada 10 mg/L).

8.13. Solución stock mix de cianotoxinas: Microcistina-LR, Cilindrospermopsina y Nodularina (MCN) (concentración aproximada de cada toxina 1 mg/L) a partir de 8.12 en una solución de agua:metanol 97:3. Estable por tres meses.

8.14. Solución de fortificación de cianotoxinas (concentración aproximada de cada cianotoxina 100 µg/L), preparada a partir de 8.13. Estable una semana.

8.15. Nitrógeno (pureza 99,9 %)

8.16. Argón alta pureza (99,998 %)

8.17. Detergente no alcalino para limpieza (Extran)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.

9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, debe ser lavado con agua y Extran, y enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona. Evaluar la necesidad de muflar el material de vidrio previo a su uso.

9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con cianotoxinas, deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

9.4. Minimizar la utilización de material de plásticos en las distintas etapas del análisis, dada la posibilidad de pérdida de toxinas por la adsorción a las superficies.

9.5. Al someter la muestra a tres ciclos de congelado/descongelado, contemplar la expansión del líquido, para evitar la fractura del recipiente de muestreo.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Para preparar las curvas de calibración en matriz (Matrix Match), se realiza el procedimiento de preparación de muestra (sección 11) utilizando agua bruta libre de los analítos de interés (blanco) y se agrega la cantidad apropiada de un mix de cianotoxinas (8.15) o diluciones del mismo en concentraciones crecientes de acuerdo con la Tabla 2. La curva de Matrix Match debe contener como mínimo 3 niveles de concentración. De igual manera, preparar un cero de curva, a partir de la muestra blanco y agua desionizada. En caso de que la matriz empleada para realizar la calibración contenga los analítos de interés, se deberán cuantificar las muestras empleando el método de adiciones estándar.

Tabla 2. Esquema de preparación de curva de calibración Matrix Match.

Nivel de concentración (µg/L)	Volumen de muestra (µL)	Concentración Mix MCN (µg/L)	Volumen de Mix MCN (µL)	Volumen de buffer FF: MeOH 80:20 (µL)(8.9)
0.1	225	1	25	0
0.25	225	5	12.5	12.5
0.5	225	10	12.5	12.5
1	225	10	25	0
2	225	50	10	15
5	225	50	25	0
10	225	100	25	0

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra

11.1. Someter la muestra a tres ciclos de congelado (-20 °C), descongelado para la liberación de toxinas intracelulares.

11.2. Homogeneizar la muestra y transferir 50 g aprox. a un frasco tipo Schoot de 250 mL. Registrar peso de la muestra en el RIN 61

11.3. Congelar las muestras en freezer a -20°C.

11.4. Colocar las muestras en el liofilizador y mantener en el proceso hasta eliminar el agua disponible (tiempo variable 48-72 horas).

11.5. Retomar el producto del liofilizado en 5 mL de solución 8.12, agitar en vórtex durante 30 segundos y colocar en un baño de ultrasonido durante 10 minutos. Transferir el contenido a un tubo de vidrio de centrífuga utilizando una pipeta Pasteur de vidrio.

11.6. Realizar un lavado del remanente del frasco Schoot utilizando 2,5 mL de solución 8.12. Repetir el paso anterior y unificar todos los lavados en un tubo de centrífuga.

11.7. Centrifugar las muestras a 1200 g durante 5 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo de vidrio compatible con el concentrador de muestras RapidVap.

11.8. Someter las muestras a evaporación en RapidVap el tiempo necesario para llegar a sequedad.

11.9. Retomar la muestra en 1 mL de solución 8.9, colocar en un baño de ultrasonido 1 minuto y filtrar mediante filtro de 0,22 µm a un vial de 2 mL.

11.10. Inyectar en el cromatógrafo líquido. La secuencia de inyección deberá estar diseñada de la siguiente manera: al menos un estándar preparado en solvente, curva de calibración en Matriz, muestras, duplicados, muestras fortificadas de controles de calidad y nuevamente la curva de calibración en matriz.

Análisis cromatográfico

11.11. Prender el cromatógrafo UHPLC-MS/MS SHIMADZU 8050. Seleccionar el método correspondiente para análisis de toxinas (LCMSCianotoxinas_RaptorARC18) y verificar que las condiciones sean las descriptas a continuación:

Fase móvil: (Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Flujo: 0,4 mL /min Sistema desgasificador. Canal A: Buffer FF (8.8) Canal B: Metanol (8.3)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	97	3
	0.5	50	50
Tiempo de corrida: 13 minutos	2.5	45	55
	5.5	25	75
	7.5	15	85
	9.0	15	85
	9.01	97	3
	13	97	3
Inyección:	Volumen inyección del método: 5 µL		
Columna:	Raptor ARC-18, 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm. Temperatura: 35 °C.		
Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI (modo positivo) Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C. Heat Block Temperature: 400 °C.		

*Parámetros del detector MS/MS para cada cianotoxina a ser determinado. Ver tabla 2.

Tabla 3. Parámetros del detector MS/MS

Cianotoxina	Tiempo de retención (min)	Ión precursor (m/z)	Ión cuantificación (m/z)	Iones referencia (m/z)	Q1 (V)	CE (eV)	q3 (V)
Microcistina LR (Mic-LR)	5,2	498,5	135,2		-28	-15,9	-25
				103,0	-26	-47,5	-33
Cilindrospermopsina (CYL)	1,3	415,8	194,1		-20	-35,8	-38
				336,2	-12	-24,2	-22
				176,2	-20	-35,8	-36
Nodularina (NOD)	4,6	825,5	135,2		-20	-55	-12
				781,4	-20	-35,8	-20
				389,2	-20	-41,2	-12

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada cianotoxina, el área del pico correspondiente a la transición de cuantificación en función de la concentración. Para el rango lineal definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde "y" es el área de la cianotoxina y "x" la concentración de dicha cianotoxina en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se evalúa la linealidad de la curva de calibración de cada cianotoxina, a partir del cálculo de residuales. Se considera un ajuste adecuado, si se obtienen valores de residuales menores al 20 %. La relación entre las curvas inyectadas al inicio del batch y al final de mismo (bracketing calibration) no debe de superar una diferencia de 30%.

12.3. Se comparan las señales de la muestra extraídas y de los estándares, para identificar los compuestos analizados. Los tiempos de retención para los analítos en las muestras, deben coincidir con el promedio de los tiempos de retención en los estándares de calibración, dentro de una tolerancia de ± 0.1 minutos. Se selecciona la transición de cuantificación (la más intensa) y una transición de confirmación, y se establece la relación entre las intensidades de estos iones, expresada como razón relativa al ion más intenso (ratio). Para las muestras extraídas, esta relación entre iones debe ser ± 30% de la calculada como promedio en los estándares de calibración utilizados.

12.4. La concentración de cada cianotoxina en la curva se calcula interpolando su área en la curva de calibración correspondiente:

$$C_{\text{muestra curva i}}\,(\mu g/L) = \frac{(\text{Área cianotoxina i}) - b}{a}$$

Siendo "a" la pendiente y "b" la ordenada en el origen de la curva de calibración.

12.5. Es posible realizar una cuantificación utilizando un solo nivel de calibración siempre y cuando el área del analito en la muestra y en el estándar sean similares (dentro de ± 30 %).

12.6. La concentración de cada toxina en la muestra, en µg/L, se calcula según:

$$C_{\text{muestra cianotoxina i}},\,(\mu g/L) = \frac{C_{\text{muestra curva i}}\,(\mu g/L) \text{ x volumen final (mL)}}{\text{Toma muestra (g)}}$$

Siendo el volumen final, el volumen de resuspensión de la muestra (11.9) y la toma de muestra corresponde al peso inicial previo al paso de liofilizado (11.2)

12.7. Se asume que la densidad de las muestras es 1 g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza un blanco de matriz, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que los cromatogramas no contengan señales que interfieran con los compuestos de interés. Además, se verificará que el solvente utilizado para la reconstitución final de las muestras no presente contaminantes que interfieran en la determinación.

13.2. **Control de recuperación de fortificaciones:** Se evalúa la recuperación de todos los analítos de interés, realizando el análisis de un fortificado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch. Para ello, fortificar una muestra con la solución 8.14 de tal forma que la concentración final corresponda a aproximadamente el límite de cuantificación. La recuperación de la adición debe estar dentro del rango 60-140 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos. En caso de no cumplimiento, evaluar la posibilidad de informar utilizando límites de reporte, repetir la determinación o el análisis completo.

La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\text{ de recuperación}_{\text{toxina i}} = \frac{((C_{\text{toxina i, muestra fortificada}} * \text{Vol}_{\text{final muestra fortificada}}) - (C_{\text{toxina i, muestra}} * \text{Vol}_{\text{muestra}}))}{(C_{\text{toxina i estándar fortificación}} * \text{Vol}_{\text{estándar fortificación}})}$$

donde:
Ctoxina i, muestra fortificada: Concentración de la toxina i calculada según 12.6, en la muestra fortificada en µg/L
Ctoxina i, muestra: Concentración de la toxina i en la muestra sin fortificar (blanco), calculada según 12.6, en µg/L
Ctoxina i estándar fortificación: Concentración del estándar utilizado para la fortificación, en µg/L
Vol final muestra fortificada: Volumen final de muestra fortificada, en mL.
Vol muestra: Volumen de muestra sin fortificar utilizado en la fortificación.
Vol estándar fortificación: Volumen de estándar agregado a la muestra fortificada

13.3. **Control de veracidad de la determinación:** En caso de ser posible, evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), utilizando un material de referencia certificado. Dicho control se prepara en forma análoga a los puntos de curva en matriz y a una concentración incluida dentro del rango de calibración. De ser posible, el material de referencia deberá incluir la totalidad de las cianotoxinas a analizar. La concentración obtenida para cada cianotoxina debe estar en el rango 60-140 % o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos. Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento analítico y evaluar la repetición del análisis del batch.

13.4. **Control continuo de calibración del equipo:** El control de calibración es utilizado para poder identificar posibles cambios de sensibilidad durante la determinación analítica. Para ello se incluye un punto de curva de concentración intermedia cada 10 inyecciones y al final de la secuencia como mínimo 3 puntos de curva. Se acepta hasta un 30 % de variación de la sensibilidad. Si se obtiene una diferencia de señal mayor al 30 % respecto a la primera inyección del estándar, evaluar la repetición parcial o total del análisis cromatográfico.

13.5. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch de muestras. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 20 %, para cada cianotoxina.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA document EPA/600/R-17/344. Single Laboratory Validated Method for Determination of Microcystins and Nodularin in Ambient Freshwaters by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). 2017

14.2. EPA document EPA/600/R-17/130. Single Laboratory Validated Method for Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Ambient Freshwaters by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). 2017

14.3. EPA Method 545, R-15/009, Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). 2015.

14.4. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, First Edition.2017

14.5. SANTE 11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2021.

SECCIÓN 8
Orgánicos

8084UY

Determinación de AOX en muestras líquidas, como aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales y soluciones resultantes del test de toxicidad en residuos sólidos

Método de adsorción en carbón activado y detección por titulación coulombimétrica

Elaborado - N. Barboza

Modificado - E. Geymonat

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1 Esta metodología se aplica para la determinación de AOX en muestras líquidas, como aguas naturales y aguas residuales domésticas e industriales y soluciones resultantes del test de toxicidad en lixiviados. En muestras de aguas, el límite de detección alcanza el valor de 5 µg/L mientras que en efluentes es 11 µg/L.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA

2.5. Procedimiento: "Simulacro de la lixiviación que ocurre cuando un residuo sólido es dispuesto en un relleno sanitario, por medio de una extracción rápida y en condiciones de pH similares al agua de lluvia, para la determinación de constituyentes no volátiles." (3261UY)

2.6. Instructivo de uso del equipo de determinación Analytik Jena Multi X 2000 (INE 73)

2.7. Instructivo de uso de módulo AP2P, Analytik Jena, para método por columna (INE 74)

2.8. Instructivo de uso de módulo DF3U, Analytik Jena, para método batch (INE 75)

2.9. Instructivo de uso de balanza Precisa de plato abierto (INE 06)

2.10. Instructivo de uso del baño con agitación y temperatura (INE 68)

2.11. Instructivo para el uso del destilador (INE 109) e instructivo de uso de desionizador (INE 82, INE121 y INE 122)

2.12. Ruta de análisis código (RIN 32)

2.13. Ruta de Preparación Soluciones Control (RPS 15).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) se definen como la suma de los compuestos halogenados (halógenos: cloro, bromo y yodo) posibles de ser adsorbidos en carbón activado. Los haluros inorgánicos extraídos por el carbón activado, son desplazados con una solución de nitrato de sodio acidificada. El carbón activado conteniendo los AOX sufre un proceso de combustión frente a corriente de oxigeno donde se forman los haluros de hidrógeno (HCl, HBr, HI). El gas de combustión conteniendo los haluros de hidrógeno es secado con ácido sulfúrico antes de ingresar a la celda coulombimétrica, donde, mediante una valoración argentométrica, se determina la concentración másica de cloruro. Los AOX se expresan como mg Cl/L.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Se requieren túnica, guantes y anteojos de protección.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. El ácido sulfúrico es altamente corrosivo, causa quemaduras, irrita el sistema respiratorio. Evitar inhalación y contacto con la piel.

5. INTERFERENCIAS

5.1. La presencia de cloro activo y algunos compuestos inorgánicos de iodo y bromo, pueden dar valores elevados de AOX. El agregado de una solución de sulfito de sodio 1 M (hasta 10 mL por litro de muestra) posteriormente al muestreo puede evitar la reacción de estos agentes oxidantes con los compuestos orgánicos de la muestra. Para verificar la presencia de cloro activo antes o después de la adición de sulfito de sodio, disolver algunos cristales de ioduro de potasio en una porción de muestra y luego agregar una solución de almidón al 1 %; un color azul indica la presencia de cloro activo. Como alternativa, utilizar un kit para la determinación de cloro libre.

5.2. El método es aplicable a muestras con contenido de iones cloruro inorgánicos menores a 1 g/L. En caso de muestras con alta concentración de iones cloruro, el método de adsorción en batch puede presentar más interferencias que el método de adsorción en columna.

5.3. Muestras con valores de carbono orgánico disuelto mayores a 100 mg/L (nota: puede considerarse como orientativo un valor de DQO mayor a 100 mg/L), pueden generar un sesgo negativo. En estos casos se debe analizar una dilución de la muestra, de manera de disminuir la materia orgánica interferente. (Según ISO 9562:2004, apartado 9.1, nota 2, se puede asumir una adsorción completa de la muestra si el carbono orgánico disuelto es menor a 10 mg/L)

5.4. Alta carga de detergentes interferirán en la medida. Para esto es conveniente diluir la muestra o usar tres columnas en simultáneo. Para este tipo de matrices es necesario chequear que la adsorción haya sido completa, en caso contrario, se requerirá de un prefiltro para aumentar la cantidad de adsorción.

5.5. Para muestras con alto contenido de sólidos suspendidos, es preferible el método de batch.

5.6. Para muestras con contenido de cloruro mayor a 1 g/L y hasta 100 g/L, y con altos valores de carbono orgánico disuelto (hasta 1000 mg/L), se debe utilizar el método de SPE-AOX descrito en el anexo A de la norma ISO 9562:2004.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un envase de vidrio color ámbar, previamente enjuagado con hexano y acetona. Un volumen de 500 mL son suficientes para análisis en aguas naturales y 100 mL para matrices del tipo efluentes. Recolectar la muestra sin cámara de aire, con contratapa de teflón, vidrio color ámbar o cubrir con papel de aluminio.

6.2. Se recomienda analizar lo antes posible. Si esto no es posible, acidificar con ácido nítrico (HNO_3 concentrado) hasta pH < 2. Refrigerar a ≤ 6 °C (> 0 °C). En esas condiciones el parámetro puede ser determinado hasta 21 días después de extraída la muestra.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo de extracción, método por columna AP 2P. Analytic Jena.

7.2. Equipo de extracción, método por batch (Buchner o DF3U)

7.3. Equipo de determinación, MULTI X 2000. Analytic Jena, con sus accesorios:
- tubo de combustión
- celda electrolítica
- tubo barboteador
- columnas de cuarzo (dimensiones: 16 mm x 8 mm, 16 mm x 10 mm, 20 mm x 10 mm).

7.4. Pipetas automáticas de volumen variable (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL).

7.5. Probetas de 100, 250 y 500 mL.

7.6. Matraces aforados de 100 mL, 500 mL y de 1000 mL

7.7. Recipientes de vidrio 300 mL aprox. (pueden ser botellas de DBO o frascos Schott).

7.8. Balanza de resolución 0,001 g

7.9. Baño de agua con control de temperatura y agitación.

7.10. Equipo desionizador de agua.

7.11. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro.

7.12. Filtros de policarbonato de 0,45 µm de tamaño de poro

Nota 1: Todo el material de vidrio debe ser enjuagado con hexano y acetona previo a su uso.

Nota 2: Las marcas mencionadas son las que cuenta el Laboratorio Ambiental de DINAMA. Cada laboratorio evaluará el equipamiento necesario para la determinación analítica.

8. REACTIVOS

8.1. Agua grado 1, según ISO 3696, con contenido de TOC inferior a 10 µg/L.

8.2. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$ Nro. CAS 64-19-7) 99 %.

8.3. Etanol (C_2H_6O Nro. CAS 64-17-5) grado PA.

8.4. Solución a: tomar 200 mL de ácido acético glacial en un matraz aforado de 1000 mL. Agregar 500 mL de agua 8.1 y 4 mL de HNO_3 concentrado. Llevar a volumen con agua 8.1. Esta solución es estable por 6 meses en el refrigerador.

8.5. Solución **b1**: agitar 4 g de gelatina en 400 mL de agua 8.1 durante 3 horas. Disolver a temperatura entre 35 y 45 °C.

8.6. Solución **b2**: disolver 1,0 g de timol ($C_{10}H_{14}O$ Nro. CAS 89-83-8), y 0,3 g de azul de timol ($C_{27}H_{30}O_5S$ Nro. CAS 76-61-9) en 500 mL de metanol (CH_3OH Nro. CAS 67-56-1) grado plaguicida.

8.7. Solución **b**: enfriar la solución b1 a 18-22 °C y lentamente agregarla sobre la solución b2. Filtrar sobre un matraz aforado de 1000 mL y enrasar con agua 8.1. Esta solución es estable por 6 meses en el refrigerador. Si se complica el filtrado se puede dejar decantar la gelatina y tomar de la solución sobrenadante.

8.8. Solución electrolítica: tomar 8 mL de la solución b en un matraz aforado de 100 mL y llevar a volumen con la solución a. Esta solución es estable por 1 mes a 20-25 °C, en recipiente de vidrio ámbar.

8.9. Solución nitrato de sodio stock: disolver 17 g de nitrato de sodio ($NaNO_3$ Nro. CAS 7631-99-4) calidad PA en agua. Agregar 25 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2) y llevar a un volumen de 1000 mL con agua 8.1. Esta solución es estable por 3 meses en botella de vidrio ámbar.

8.10. Solución de nitrato de sodio de lavado: tomar 50 mL de la solución de $NaNO_3$ stock y llevar a 1000 mL con agua 8.1. Esta solución es estable por 1 mes en botella de vidrio ámbar.

8.11. Ácido 2-clorobenzoico, solución madre (250 mg/L AOX): en un matraz aforado de 100 mL, se disuelven 110,4 mg de ácido 2-clorobenzoico (ClC_6H_4COOH Nro. CAS 118-91-2) con agua 8.1 y se lleva a volumen. La disolución del ácido 2-clorobenzoico es muy lenta, por lo que es recomendable prepararla el día previo a su utilización. Esta solución puede conservarse hasta un mes en recipiente de vidrio, y a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C).

8.12. 4-Clorofenol, solución stock (200 mg/L de AOX): Disolver 72,5 mg de 4-Clorofenol (C_6H_5ClO Nro. CAS 106-48-9) en agua 8.1 en un matraz aforado de 100 mL y llevar a volumen con agua 8.1. Se puede utilizar material de referencia certificado de 4-clorofenol, de 200 mg/L AOX (Merck HC132611 o similar).

8.13. Ácido clorhídrico diluido (HCl Nro. CAS 7647-01-0): Concentración 0,010 mol/L. La molaridad debe ser conocida exactamente ya que se usa para chequear la titulación.

8.14. Ácido nítrico (HNO_3 Nro. CAS 7697-37-2), 65 % (densidad 1,4 g/mL)

8.15. Ácido nítrico diluido, 0,02 mol/L. Esta dilución se utiliza como blanco de reactivo.

8.16. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 Nro. CAS 7664-93-9), 1,84 g/mL.

8.17. Solución de sulfito de sodio (Na_2SO_3 Nro. CAS 7757-83-7). En un matraz de 1000 mL, disolver 126 g de Na_2SO_3 calidad PA. Esta solución es estable durante un mes si se conserva a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C)

8.18. Ioduro de potasio (KI Nro. CAS 7681-11-0), calidad PA.

8.19. Solución de almidón ($[8C_6H_{10}O_5]n$ Nro. CAS 9005-25-8), con una fracción másica de 1 %.

8.20. Carbón activado para método de adsorción **por columna**: tamaño de partículas: 50-150 µm, índice de yodo > 1050 y valor de blanco < 15 µg/g Cl. Marca Analytik Jena, código: 402-810.004 o similar.

8.21. Carbón activado para método de adsorción **por batch**: tamaño de partículas: 50-150 µm, índice de yodo > 1050 y valor de blanco < 15 µg/g Cl. Marca Analytik Jena, código: 402-810.025 o similar.

8.22. Carbón activado para filtro: marca Analytik Jena, código: 402-810.031 o similar.

8.23. Oxígeno, pureza 99,95 %.

8.24. Lana de cerámica: muflar a 550 °C por dos horas antes de usar. Guardar en tubo de vidrio limpio con tapa rosca.

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

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

Previamente al análisis de las muestras, es necesario realizar las siguientes etapas con el equipo utilizado para la determinación:

9.1. Retirar el tubo de combustión, extraer las columnas que hayan quedado del día anterior, utilizando guantes para la operación, enjuagar el exterior del mismo con etanol.

9.2. Descartar el H_2SO_4 del tubo barboteador y rellenar con una nueva porción de 15 mL. Si se encuentran gotas en las paredes arrastrarlas con agua, previo al agregado del nuevo ácido.

9.3. Descartar la solución electrolítica, enjuagar con una nueva porción y colocar entre 15 y 20 mL de nueva solución electrolítica. Verificar la fecha de vencimiento. Si por alguna razón se requiere repetir el end point routine del equipo, cambiar la solución electrolítica.

9.4. Verificar el estado del electrodo y de la pastilla magnética de la celda. La pastilla magnética no deberá contener depósitos sólidos, de lo contrario limpiarla cuidadosamente con una lija de papel.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Soluciones de verificación: a partir del material de referencia 8.11 u 8.12 preparar al menos 5 soluciones estándares (por ejemplo 30, 50, 100, 150 y 250 µg/L AOX). Se comparan los resultados medidos con los resultados nominales (% recuperación) y se grafica la concentración nominal (x) vs la concentración medida (y). El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0,999 y los % de recuperación deben estar entre 95 -105 %. Estas soluciones de verificación se analizan al menos una vez al año.

10.2. Solución control: a partir del material de referencia 8.11 u 8.12 preparar una solución de concentración final 50 µg/L o 100 µg/L AOX. Cada 100 mL de solución, se agregan 5 mL de solución stock de nitrato de sodio y se lleva a pH < 2 con HNO_3 (0,2 mL de HNO_3 concentrado es suficiente).

10.3. Se registra la toma del estándar original y el volumen final de la solución, en la ruta de análisis correspondiente.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Para aguas naturales, tomar 100 mL de muestra y analizar sin dilución. Los efluentes industriales deben analizarse diluidos (mínimo 1/20) tomando no menos de 5 mL de muestra y llevando a 100 mL con agua 8.1. Registrar la toma de muestra y el volumen final en el RIN 32.

Nota 4: Las tomas de muestra se realizan en balanza con resolución de 0,001 g. Se considera la densidad de la muestra igual a 1 g/mL; en caso contrario, corregir según la densidad de la muestra inicial y final.

11.2. Acidificar la porción de muestra hasta pH < 2 con HNO_3 en el caso de no haber sido preservada en el momento de recepción de la misma (para aguas naturales y efluentes industriales diluidos 0,2 mL de HNO_3 concentrado en general es suficiente).

11.3. Adicionar 5 mL de solución stock de nitrato de sodio, cada 100 mL de muestra (o dilución de muestra apropiada).

11.4. Proceder a la adsorción de la muestra en carbón activado.

11.4.1. **Método de columna**

11.4.1.1. Preparar diariamente las columnas de carbón activado (columnas de cuarzo de 16 mm x 10 mm con lana de cerámica muflada en los extremos) y cargar los dúplex.

11.4.1.2. Verificar el nivel de $NaNO_3$ de lavado en el recipiente correspondiente y cantidad de muestra suficiente.

11.4.1.3. Colocar las muestras sobre los agitadores magnéticos del módulo AP2P, agregando una pastilla magnética.

11.4.1.4. Seguir los pasos del INE 74 (por cada par de muestras, la extracción demora aproximadamente 35 minutos)

11.4.1.5. Retirar los dúplex y colocarlos sobre papel para eliminar el exceso de agua.

Nota 5: Para muestras con alta carga de partículas, es conveniente utilizar el triplex, siendo la primera columna un filtro de lana de cerámica. Si la muestra además contiene altas cantidades de detergente, es conveniente utilizar la primera columna (del triplex) con carbón activado. Posteriormente se queman las tres partes, y por lo general es el prefiltro y la primer columna juntas y después la segunda columna.

Nota 6: Para el caso de muestras salinas, se requiere de un pretratamiento de la muestra utilizando columnas de extracción en fase solida (SPE) según Anexo A de método ISO 9562:2004.

11.4.2. **Método de batch**

11.4.2.1. Agregar 50 mg de carbón activado para método batch (8.23) a la muestra.

11.4.2.2. Agitar la muestra durante una hora en baño de agua INE 68

11.4.2.3. La filtración puede hacerse de dos maneras diferentes:

Método de filtración con Büchner

a) Tomar la muestra y filtrarla a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro de 0,45 µm, y diámetro 47 mm.

b) Llenar la columna de cuarzo (20 x 10 mm) con cerámica de vidrio, aproximadamente 70 % de la capacidad.

c) Utilizando una piseta, enjuagar con 25 mL de $NaNO_3$ el recipiente utilizado para la agitación, incluyendo el tapón, de manera de arrastrar todo el carbón que pueda haber quedado retenido. No es posible utilizar más de 25 mL de $NaNO_3$ porque puede disminuir la recuperación de AOX

d) No secar el filtro en exceso, para evitar adsorber compuestos halogenados del ambiente de trabajo y evitar secar el carbón activado.

e) Con la ayuda de 2 pinzas, doblar dos veces el filtro de policarbonato para poder colocarlo dentro de las columnas de cuarzo de 20 mm x 10 mm conteniendo la lana de cerámica.

f) Colocar nuevamente lana de cerámica sobre el carbón.

Método de filtración con módulo DF 3U

a) Seguir las instrucciones del INE 75.

b) Lavar los recipientes de filtración previamente al uso con solución stock de $NaNO_3$. Si continúan sucios, utilizar etanol como solvente de limpieza.

c) Cubrir un 70 % de las columnas de cuarzo de 20 mm x 10 mm con lana de cerámica.

d) Cerrar las tapas de cada recipiente de filtración y prender la bomba para hacer vacío.

e) Volcar rápidamente las muestras para evitar que el carbón quede en el vaso original.

f) Enjuagar las muestras y los recipientes de filtración con $NaNO_3$ de lavado (máximo 25 mL)

En el último enjuague, secar las columnas pero no demasiado para no introducir contaminación del ambiente de trabajo a la columna y evitar secar el carbón activado.

g) Colocar nuevamente lana de cerámica sobre el carbón activado.

Nota 7: Las columnas con lana de cerámica utilizada pueden limpiarse en el tubo de combustión, o en mufla a 1000 °C previo al uso, debiendo retirar previamente el carbón activado del análisis previo.

11.5. Una vez realizada la adsorción por cualquiera de los métodos propuestos seguir las instrucciones en el INE 73.

12. ANÁLISIS DE DATOS

12.1. Método de absorción por columna: el equipo reporta un valor absoluto de cloruro por cada columna analizada. Cargar estos datos en la planilla de cálculo. El valor de AOX, en µg/L se calcula de la siguiente forma:

$$AOX\ (\mu g/L) = \frac{(\mu g\ Cl^-\ columna\ 1 + \mu g\ Cl^-\ columna\ 2) \times 1000 \times FD}{V\ muestra\ adsorbida\ (mL)}$$

donde:

V muestra absorbida = 50 mL (adsorción realizada con módulo AP 2P)

FD: corresponde al V final, g (incluyendo agregado de solución stock de $NaNO_3$ y HNO_3) / toma de muestra, g

Nota 8: Tratar el blanco como una muestra. En caso que amerite, se corrige el valor absoluto de Cl- de la muestra con el valor absoluto de Cl- del blanco. Lo que puede ser cargado directamente en el software (measuring simple data).

12.2. Método de adsorción por batch:

$$AOX\ (\mu g/L) = \frac{\mu g\ Cl^-\ columna \times 1000 \times FD}{V\ muestra\ (mL)}$$

donde:

FD corresponde al V final, g (incluyendo agregado de solución stock de $NaNO_3$ y HNO_3) / toma de muestra, g

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Controles del equipo utilizado para la determinación:

13.1. Empty sample: se determina una posición vacía del autosampler como una muestra. El contenido absoluto de cloruro no deberá superar los 0,2 µg.

13.2. Cell test: Agregar 20 µL de HCl 0,01N directamente a la celda coulombimética. El contenido absoluto de cloruro debe ser de 7,10 µg Cl ± 5 % (6,74 – 7,46 µg Cl).

13.3. Oven test: Fortificar una columna de cuarzo (de 20 x 10 mm) con lana de cerámica con 50 µL de HCl 0,01 N y tratarla como una muestra. El contenido de cloruro absoluto debe ser de 17,75 µg Cl ± 5 % (16,86 – 18,64 µg Cl-)

Controles de calidad analíticos:

13.4. **Control de exactitud:** Analizar en cada corrida una solución control preparada según 10.2. El porcentaje de recuperación debe estar en el rango de 90-110 %; en caso de no cumplirse, se evaluará la repetición del análisis. Los porcentajes de recuperación se registran en un gráfico de control con límites de control fijos en 90 y 110 %.

13.5. **Control de precisión:** Analizar un duplicado cada 5 muestras en el caso de muestras de aguas naturales, mínimo un duplicado por serie de muestras. Los efluentes industriales se analizan todos por duplicado. Se acepta hasta un 20 % de dispersión, expresada como rango normalizado de duplicados. En el caso de trabajar con diluciones distintas, se acepta el promedio de ambas siempre y cuando la dispersión sea menor que 10 %, de lo contrario repetir el análisis con la mayor dilución.

13.6. **Control de blancos:** En cada corrida, analizar al menos un blanco de reactivos (8.15). Se aceptan los blancos si la concentración de AOX en los mismos es inferior a 30 µg/L (para un volumen de muestra de 100 mL). En caso que amerite, se podrá restar el aporte del blanco a las muestras analizadas (en particular, cuando se realizan diluciones de las muestras, considerando el aporte del agua desionizada utilizada para diluir). Los valores de los blancos se registran en un gráfico de control de blancos.

13.7. **Control del carbón activado (para el método de adsorción en columna):** en cada corrida, analizar al menos una columna de cuarzo con carbón activado para evaluar su aporte. En caso que amerite, se podrá restar el aporte de la misma para obtener el resultado de AOX en la muestra/control.

13.8. **Chequeo de adsorción:** Cuando se realice adsorción por método de columna, se debe calcular la eficacia de la adsorción (EA), según la siguiente ecuación:

$$\%\ EA = \frac{(\mu g\ Cl^-_{columna\ 2\ muestra} - \mu g\ Cl^-_{columna\ 2\ blanco}) \times 100}{(\mu g\ Cl^-_{columna\ 1\ muestra} - \mu g\ Cl^-_{columna\ 1\ blanco}) + (\mu g\ Cl^-_{columna\ 2\ muestra} - \mu g\ Cl^-_{columna\ 2\ blanco})}$$

El % EA deberá ser menor o igual al 25 % para aceptar el análisis; de lo contrario evaluar la repetición del análisis con una dilución mayor.

13.9. En casos de matrices complejas o que el análisis presente anomalías, es posible analizar la muestra fortificada y evaluar el porcentaje de recuperación de la adición. Para la adición se utilizará la misma solución utilizada para 13.4

13.10. En el caso de análisis de aguas, fortificar al menos una muestra por batch (mínimo 1 cada 10), de manera de asegurar el límite de cuantificación.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Método ISO 9562:2004 3ª Edición. Determinación de compuestos halogenados adsorbibles (AOX).

14.2. Manual de Instrucciones de operaciones multi X 2000. IDC Analytic System. Analytic Jena.

14.3. Manual de Instrucciones de operaciones AP 2P. Analytic System. Analytic Jena.

14.4. Manual de Instrucciones de operaciones DF 3U. Analytic System. Analytic Jena

14.5. EPA 1650 Revision C, 1997. Adsorbable Organic Halides by Adsorption and Coulometric Titration.

8089UY

Determinación de plaguicidas en aguas naturales

Extracción Líquido-Líquido y determinación por Cromatografía Gaseosa (GC) con detector de µECD

Elaborado - L. Diana, J. López

Modificado - C. Capeci

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de 43 plaguicidas en muestras de aguas naturales, en los rangos de trabajo especificados:

Tabla 1- Listado de plaguicidas validados para la presente metodología analítica

Name	Nombre	Número CAS	Rango de trabajo (µg/L)	Límite de cuantificación (µg/L)
Diuron	Diuron	330-54-1	0,008-0,2	0,008
Atrazine deisopropyl	Atrazina desisopropil	1007-28-9	0,1-0,60	0,1
Atrazine desethyl	Atrazina desetil	6190-65-4	0,02-0,60	0,02
Trifluralin	Trifluralina	1582-09-8	0,004-0,02	0,004
Simazine	Simazina	122-34-9	0,2-1,2	0,2
Hexachlorobenzene	Hexaclorobenceno	118-74-1	0,002-0,01	0,002
Atrazine	Atrazina	1912-24-9	0,05-1,2	0,05
Lindane	Lindano	58-89-9	0,0004-0,01	0,0004
Diazinon	Diazinon	333-41-5	0,004-0,08	0,004
Parathion methyl	Metil Paratión	298-00-0	0,002-0,04	0,002
Chlorpyrifos methyl	Clorpirifós metil	277-011-5	0,0008-0,02	0,0008
Alachlor	Alacloro	15972-60-8	0,002-0,04	0,002
Heptachlor	Heptacloro	76-44-8	0,004-0,02	0,004
Malathion	Malatión	121-75-5	0,01-0,06	0,01
Aldrin	Aldrin	309-00-2	0,0008-0,02	0,0008
Heptachlor epoxide (isomer B)	Heptacloro epóxido (isómero B)	1024-57-3	0,0008-0,02	0,0008
Captan	Captan	133-06-2	0,002-0,04	0,002
Fipronil	Fipronil	120068-37-3	0,0008-0,02	0,0008
Chlordane (Trans)	Clordano (Trans)	5103-74-2	0,0008-0,02	0,0008
o,p' DDE	o,p’ DDE	3424-82-6	0,0008-0,02	0,0008
Alpha Endosulfan	Endosulfan alfa	959-98-8	0,0008-0,02	0,0008
Chlordane (Cis)	Clordano (Cis)	5103-71-9	0,0008-0,02	0,0008
Dieldrin	Dieldrin	60-57-1	0,0008-0,02	0,0008
p,p' DDE	p,p’ DDE	72-55-9	0,004-0,02	0,004
o,p' DDD	o,p’ DDD	53-19-0	0,0008-0,02	0,0008
Endrin	Endrin	72-20-8	0,0008-0,02	0,0008
Beta Endosulfan	Endosulfan beta	33213-65-9	0,0008-0,02	0,0008
p,p' DDD	p,p’ DDD	72-54-8	0,0008-0,02	0,0008
o,p' DDT	o,p’ DDT	789-02-6	0,0008-0,02	0,0008
Ethion	Etión	563-12-2	0,002-0,04	0,002
Endosulfan sulfate	Endosulfan sulfato	1031-07-8	0,0008-0,02	0,0008
p,p' DDT	p,p’ DDT	50-29-3	0,0008-0,01	0,0008
Trifloxystrobin	Trifloxiestrobina	141517-21-7	0,004-0,02	0,004
Fluroxypyr (methylheptyl ester)	Fluroxipir (éster metilheptil)	69377-81-7	0,008-0,04	0,008
Methoxychlor	Metoxiclor	72-43-5	0,004-0,02	0,004
Mirex	Mirex	2385-85-5	0,0008-0,02	0,0008
Lambda-Cyhalothrin	Lambda-Cialotrina	91465-08-6	0,002-0,04	0,002
Permethrin	Permetrina	52645-53-1	0,002-0,04	0,002
Cyfluthrin	Ciflutrina	68359-37-5	0,002-0,04	0,002
Cypermethrin	Cipermetrina	52315-07-8	0,002-0,04	0,002
Deltamethrin	Deltametrina	52918-63-5	0,002-0,04	0,002
Azoxystrobin	Azoxiestrobina	131860-33-8	0,003-0,08	0,003

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del cromatógrafo de gases HP 6890 (INE 67)
2.6. Procedimiento de preparación de soluciones de referencia, para el análisis multiresiduos de plaguicidas (PGC 22)
2.7. Instructivos de uso de balanzas (según corresponda INE 06, INE 07, INE 93 o INE 115)
2.8. Ruta de análisis de plaguicidas en aguas naturales (RIN 44)
2.9. Registro de Identificación y confirmación de plaguicidas en muestras (RIN 50)
2.10. Registro de curva de calibración para análisis de plaguicidas por L-L GC (RIN 52)
2.11. Registro de controles de calidad para análisis de plaguicidas por L-L GC (Scope acotado) (RIN 53-A)
2.12. Registro de controles de calidad para análisis de plaguicidas por L-L GC (Scope completo) (RIN 53-B)
2.13. Instructivo de uso de la bomba de vacío Gast (INE 02)
2.14. Instructivo de uso centrífuga Eppendorf 5810 (Rotor A-4-81) (INE 124)
2.15. Instructivo de uso de rotavapores (INE 114)
2.16. Instructivo de uso de concentrador de muestras Labconco modelo RapidVap (INE 127)
2.17. Instructivo de uso de desionizador Milli-Q (INE 121)
2.18. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108)
2.19. Instructivo de uso Agitador orbital (INE 117)
2.20. Instructivo de uso de mufla (INE 27)
2.21. Instructivo de uso de estufa (INE 107, INE 101)
2.22. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINAMA (ES 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los plaguicidas son extraídos de la matriz agua utilizando acetato de etilo como solvente extractante. El proceso es asistido por agitación mecánica y mediante ultrasonido. La separación de fases es favorecida por el uso de centrifugación. El extracto es concentrado inicialmente mediante destilador rotatorio con vacío y posteriormente en un bloque calefactor a 30 °C bajo corriente de N2. El extracto obtenido es tratado con sulfato de sodio para eliminar restos de agua del proceso.
3.2. Los analitos se determinan por cromatografía de gases con detector de micro captura electrónica (GC-µECD).
3.3. La identificación de los plaguicidas presentes en las muestras, se realiza por comparación de los tiempos de retención, entre el cromatograma de la muestra y el correspondiente al estándar inyectado en la misma serie de análisis.
3.4. Para la confirmación de los mismos, se emplea una segunda columna de distinta polaridad.
3.5. La cuantificación de cada plaguicida, se realiza por interpolación del área de la señal cromatográfica, en la curva de calibración correspondiente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes para la manipulación de la muestra.
4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
4.3. Todos los reactivos se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

5.1. Otros compuestos extraídos de la muestra que posean en su estructura átomos electronegativos (halógenos, oxígeno, nitrógeno, azufre) son detectados por el detector de captura electrónica y pueden coincidir total o parcialmente con las señales de interés. En dichos casos, y para minimizar esta interferencia, se realiza la confirmación cromatográfica por una segunda columna de distinta polaridad.
5.2. Ésteres de ftalatos: se debe evitar la utilización de materiales plásticos ya que los ftalatos son usados frecuentemente como plastificantes y son fácilmente extraídos durante el procesamiento de la muestra. Éstos interfieren en la determinación cromatográfica.
5.3. Restos de jabón (dodecil sulfato de sodio): genera un pH básico en la superficie del material de vidrio, el cual puede degradar parcialmente algunos analitos (especialmente aldrin y heptaclor).
5.4. El DDT y Endrin son muy susceptibles a la degradación debido a contaminación en el inyector.
5.5. La utilización de lana de vidrio en el liner favorece la degradación de algunos compuestos tales como DDT y Aldrin, por lo cual se deberán emplear únicamente liners sin lana de vidrio en el inyector del equipo.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en una botella de 1 L de vidrio ámbar, previamente enjuagada con hexano y acetona, con contratapa de teflón enjuagada con acetona (o papel aluminio).
6.2. Preservar las muestras a ≤6 °C (>0 °C). El tiempo máximo de almacenamiento son 7 días para la extracción y 40 días para la determinación.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo de gases marca HP, modelo 6890, equipado con:
- Columna cromatográfica HP-1, 30 m; 0,25 mm id; 0,25 µm film o similar
- Columna cromatográfica HP-5 (5% fenilo), 30 m; 0,25 mm id; 0,25 µm film o similar
- Detector de micro captura electrónica (µECD)
- Inyector split/splitless

En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares, que permita las prestaciones aquí establecidas.

7.2. Balanza de resolución 0,001 g (IN 594 ó IN 20).
7.3. Balanza de resolución 0,00001 g (FQ 416 ó IN 19).
7.4. Viales de vidrio ámbar de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.
7.5. Insertos cónicos de vidrio de 300 µL, compatibles con viales de 2 mL.
7.6. Microjeringas de vidrio de 10, 50, 250 y 1000 µL.
7.7. Dispensador de botella para volúmenes de 1-10 mL adecuado para solventes (IN 642), unido a frasco tipo Schott de borosilicato de 1L.
7.8. Desionizador Milli-Q (FQ 605).
7.9. Frascos tipo SCHOTT de borosilicato de 250 mL con tapa rosca y contratapa de PTFE.
7.10. Agitador orbital (IN 601).
7.11. Baño de agua con ultrasonido (IN 554, IN 614).
7.12. Pipetas Pasteur de vidrio y bulbos de goma correspondientes.
7.13. Centrífuga con adaptadores para frascos de 250 mL (MB 609).
7.14. Balón de vidrio, fondo redondeado o tipo pera, con capacidad mínima de 100 mL, adecuado para rotavapor.
7.15. Equipo de destilación rotatorio (rotavapor compuesto por baño de agua, ajuste de temperatura variable, condensador, balón recolector de solvente, trampa de agua para vacío y refrigeración del condensador o equipo similar) (IN 454, FQ 555).
7.16. Bomba de vacío marca Gast-Motor GM (IN 247, IN 592 o similar).
7.17. Concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2 (IN 610).
7.18. Tubos de vidrio con fondo cónico para concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2.
7.19. Estufa de secado (FQ 549, FQ 492).

7.20. Mufla (FQ 146).

7.21. Agitador reciprocante (IN794).

7.22. Micro-jeringa de 100µL

8. REACTIVOS

8.1. Hexano libre de plaguicidas $CH_3(CH_2)_4CH_3$ Nro. CAS 110-54-3 (marca Baker, Mallinckrodt o similar).

8.2. Acetona libre de plaguicidas $(CH_3)_2CO$ Nro. CAS 67-64-1 (Baker, Mallinckrodt o similar).

8.3. Acetato de etilo grado plaguicidas $CH_3COOC_2H_5$ Nro. CAS 141-78-6 (Baker, Mallinckrodt o similar).

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

8.5. Sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 Nro. CAS 7757-82-6 (Merck, Mallinckrodt o similar). Previo a su uso, secar en estufa a 105 ºC durante 1 hora. Limpiar inicialmente con mufla 4 horas a 440°C, luego conservar en desecador.

8.6. Lana de vidrio previamente enjuagada con hexano y acetona.

8.7. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la **Tabla 1** del presente documento.

8.8. **Solución stock de cada plaguicida (concentración aproximada 1000 mg/L)**: se prepara según lo establecido en el punto 5.1 del PGC 22.

8.9. **Solución stock mix de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 0,5 mg/L)**: se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22.

8.10. **Solución de fortificación de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 0.4 µg/L)**: A partir de la solución 8.9, realizar diluciones adecuadas a fin de obtener una solución que posea una concentración aproximada de 0,4 µg/L. Dicha solución se prepara en acetona y para realizar la toma, se emplea una jeringa (7.6) adecuada. Esta solución, debido a la volatilidad de la acetona, se prepara el mismo día en que se realiza la extracción del fortificado. La información relativa a la misma se registra en el RIN 44.

8.11. **Solución de fortificación de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 2 µg/L)**: A partir de la solución 8.9, realizar diluciones adecuadas a fin de obtener una solución que posea una concentración aproximada de 2 µg/L. Esta solución se prepara en acetona y para realizar la toma, se emplea una jeringa (7.6) adecuada. Debido a la volatilidad de la acetona, dicha solución se prepara el mismo día en que se realiza la extracción del fortificado. La información relativa a la misma se registra en el RIN 44.

8.12. **Solución estándar para control de veracidad de la determinación:** se prepara según lo establecido en el punto 5.3 del PGC 22.

8.13. Nitrógeno alta pureza (5.0 o ≥ 99,999%)

8.14. Nitrógeno (pureza 99,9%)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.

9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, tanto para la toma de muestra como para la etapa de extracción, debe enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona, libres de plaguicidas. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.

9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

Puntos críticos en el análisis de muestras

9.4. Evitar evaporar a sequedad en el proceso de concentración del extracto mediante rotavapor.

9.5. En la etapa de concentración por evaporación con arrastre de N_2, es importante interrumpir el proceso de concentración inmediatamente después de que la muestra llegue a sequedad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La calibración se realiza mediante una curva preparada en matriz (Matrix Match Calibration) a fin de compensar el efecto de la misma sobre los plaguicidas de interés. Realizar la extracción de al menos 5 porciones de una matriz blanco en forma análoga a las muestras. En la etapa de reconstitución del extracto final se agrega la cantidad correspondiente de solución mix de plaguicidas o una dilución, empleando jeringas de vidrio (7.6), de manera de obtener distintas concentraciones que cubran todo el rango lineal. En todos los casos se mantiene el volumen final de 200 µL. Registrar su preparación en el RIN 44. En el caso de preparar diluciones de la solución mix, estas deben ser preparadas al momento de ser utilizadas.

10.2. Analizar dichas soluciones utilizando el mismo método cromatográfico que se emplea para las muestras y determinar la curva de calibración para cada plaguicida, según 12.1. Las soluciones estándar en matriz deberán prepararse para cada batch de análisis.

10.3. La identificación de los plaguicidas en la solución mix (8.7.2) se realiza a partir de los tiempos de retención de los estándares individuales, para determinadas condiciones cromatográficas.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

11.1. Homogeneizar la muestra.

11.2. Realizar una toma de aproximadamente 100 mL registrando el peso en el RIN 44; esta toma debe realizarse en un frasco tipo SCHOTT (7.9), utilizando la balanza 7.2.

11.3. Agregar 40 mL de acetato de etilo y agitar en un agitador orbital (7.10) durante 15 minutos, a una velocidad de 300 rpm.

11.4. A continuación, colocar el batch en un baño de agua con ultrasonido (7.11) durante 5 minutos.

11.5. Posteriormente colocar el batch en una centrífuga (7.13), a 2000 rpm durante 10 minutos. Para evitar la ruptura de frascos en esta etapa, la diferencia entre los pares de frascos opuestos en la centrífuga no deberá exceder 1 g. De lo contrario, agregar acetato de etilo a la muestra de menor peso, hasta obtener una diferencia adecuada.

11.6. Extraer la capa orgánica a un balón de vidrio adecuado para rotavapor (7.14), empleando para ello una pipeta Pasteur (7.12). Evitar el pasaje de fase acuosa.

11.7. Agregar una segunda fracción de 30 mL de acetato de etilo, al frasco conteniendo la muestra.

11.8. Agitar en un agitador orbital durante 15 minutos a 300 rpm y luego colocar en un baño de agua con ultrasonido durante 5 minutos.

11.9. Centrifugar la muestra a 2000 rpm durante 10 minutos.

11.10. Extraer nuevamente la capa orgánica y transferirla al balón conteniendo la primera fracción de acetato de etilo.

11.11. Empleando el equipo de destilación rotatorio 7.15 (temperatura del baño a 30ºC y la velocidad de rotación a 45 rpm), concentrar el contenido del balón hasta un volumen aproximado de 4 mL. Es muy importante en esta etapa que el extracto no llegue a sequedad.

11.12. Preparar para cada muestra, una columna de secado de extracto. Para ello colocar lana de vidrio (8.6) en la parte inferior de una pipeta Pasteur y agregar a continuación aproximadamente 4 g de sulfato de sodio anhidro (8.5).

11.13. Hacer pasar el volumen de extracto remanente en el balón por la columna de secado y recoger en un tubo de fondo cónico (7.18), eluyendo por gravedad.

11.14. Enjuagar el balón con dos fracciones de aproximadamente 1 mL de acetato de etilo. Hacer pasar dicho volumen por la columna de secado y recoger en el tubo correspondiente a la muestra.

11.15. Concentrar el extracto en un bloque calefactor a 30 °C bajo corriente de N2 (7.17) hasta sequedad.

11.16. Agregar 200 µL de acetato de etilo con jeringa de vidrio, al tubo cónico correspondiente a la muestra. Sonicar durante un minuto.

11.17. Transferir el extracto a un vial de vidrio ámbar de 2 mL con inserto (7.5) e inyectar en el cromatógrafo de gases (7.1).

Análisis cromatográfico

11.18. Prender el cromatógrafo de gases HP 6890, según INE 67. Seleccionar el método PLAGUICIDASTOTAL-HP5 y verificar que las condiciones del mismo sean las descriptas a continuación:

• **Inyector:** (verificar que el liner no tenga lana de vidrio para evitar la degradación en el inyector)	Temperatura: 290 °C Modo de inyección: splitless, con apertura de Split a los 0.50 min, flujo de purga 70 mL/min			
	Condiciones del inyector automático: Volumen inyección: 2 µL FAST plunger Viscosity delay: 2 segundos Solvente A y B: Acetato de etilo			
	Washes	**Pre injection**	**Post injection**	
	Sample	1	---	
	Solvent A	2	3	
	Solvent B	2	0	
	Pumps	3	---	
• **Horno:**	Programa de gradiente de temperatura:			
	Rampa	**°C/min**	**°C**	**Hold time(min)**
	Inicial	-	120	0
	Rampa 1	10	150	2
	Rampa 2	2.3	220	0
	Rampa 3	0.5	223	0
	Rampa 4	8	305	1.5
	Tiempo total de corrida: 53,2 minutos			
• **Columna:**	HP-5 (5% fenilo), 30 m; 0,25 mm id; 0,25 µm film Flujo del gas carrier (N_2) constante: 0.9 mL/min			
• **Detector µECD:**	Temperatura: 300 °C Make-up: N_2 30,0 mL/min			

Para estas condiciones cromatográficas, el orden de elución es el siguiente:

Compuesto	**tR (min)***
Diuron	4,50
Atrazina desisopropil	11,34
Atrazina desetil	11,75
Trifluralina	12,37
Hexaclorobenceno	13,35
Simazina	14,16
Atrazina	14,53
Lindano	14,92
Diazinon	16,42
Metil Paratión/ Clorpirifós metil	19,31
Heptacloro	19,53
Alacloro	19,90
Aldrin	21,85
Malatión	22,31
Heptacloro epóxido (B)	24,77
Captan	25,46
Fipronil	26,24
Clordano (Trans)	26,48
o,p’ DDE	27,14
Endosulfan alfa	27,30
Clordano (Cis)	27,60
Dieldrin	29,20
p,p’ DDE	29,52
o,p’ DDD	30,07
Endrin	30,71
Endosulfan beta	31,45
p,p’ DDD	32,57
o,p’ DDT	32,71
Etión	33,26
Endosulfan sulfato	34,66
p,p’ DDT	35,28
Trifloxiestrobina	36,31
Fluroxipir (éster metilheptil)	37,17
Metoxiclor	40,47
Mirex	42,73
Lambda-Cialotrina	44,86
Permetrina	46,83
Ciflutrina	47,90/48,10/48,24/48,33
Cipermetrina	48,47/48,68/48,80/48,88
Deltametrina	51,23
Azoxiestrobina	51,66

*Los tiempos de retención pueden cambiar por la realización de tareas de mantenimiento instrumental.

Nota 6: Las condiciones cromatográficas definidas anteriormente, pueden ser modificadas de manera de mantener la resolución y sensibilidad adecuada para el análisis.

11.19. Método de confirmación

Sustituir la columna utilizada (HP-5) por una columna HP-1 (o de similares características). Seleccionar el método PLAGUICIDASTOTALCONF-HP1 y verificar que las condiciones del método sean las establecidas a continuación:

• Inyector:	Los parámetros del inyector son los mismos a los establecidos para el método PLAGUICIDASTOTAL-HP5.			
	Condiciones del inyector automático: Volumen inyección: 2 µL FAST plunger Viscosity delay: 2 segundos Solvente A y B: Acetato de etilo			
• Horno:	Programa de gradiente de temperatura:			
	Rampa	**°C/min**	**°C**	**Hold time(min)**
	Inicial	-	150	1
	Rampa 1	3	190	1
	Rampa 2	0.7	212	0
	Rampa 3	2	215	0
	Rampa 4	45	280	0
	Rampa 5	1.5	290	0
	Tiempo total de corrida: 56.4 minutos			
• Columna:	HP-1 (100% Dimethylpolysiloxane), 30 m; 0,25 mm id; 0,25 µm film Gradiente de flujo del gas carrier (N_2):			
	Rampa	mL/min por min	mL/min	Hold time(min)
	Inicial	-	0.9	31
	Rampa 1	0.5	1.3	10
	Rampa 2	2	1.8	16
• Detector µECD:	Temperatura: 300 °C Make-up: N_2 30,0 mL/min			

En caso de no disponer de una columna tipo HP-1 (100% Dimethylpolysiloxane), se podrá utilizar otra columna de similar polaridad, ajustando las condiciones cromatográficas de manera tal que sea posible resolver las señales de los analitos de interés.

Para estas condiciones cromatográficas, el orden de elución es el siguiente:

Compuesto	tR (min)*
Diuron	3,59
Atrazina desisopropil	7,92
Atrazina desetil	8,27
Trifluralina	9,35
Simazina	9,93
Hexaclorobenceno	10,10
Atrazina	10,27
Lindano	10,65
Diazinon	11,94
Metil Paratión	13,75
Clorpirifós metil	13,96
Alacloro	14,54
Heptacloro	14,71
Malatión	16,14
Aldrin	16,77
Captan	18,35
Heptacloro epóxido (isómero B)	19,08
Fipronil	19,92
Clordano (Trans)	20,75
o,p’ DDE	21,50
Endosulfan alfa	21,83
Clordano (Cis)	22,16
Dieldrin	24,05
p,p’ DDE	24,37
o,p’ DDD	24,72
Endrin	25,69
Endosulfan beta	25,96
p,p’ DDD	27,97
o,p’ DDT	28,87
Etion	29,10
Endosulfan sulfato	30,35
p,p’ DDT	32,46
Trifloxiestrobina	33,52
Fluroxipir (éster metilheptil)	34,99
Metoxiclor	38,75
Mirex	42,70
Lambda-Cialotrina	46,84
Permetrina	49,53
Ciflutrina	50,11/50,23/50,32/50,40
Cipermetrina	50,45/50,60/50,68/50,75
Deltametrina/Azoxiestrobina	52,61

11.20. **Secuencia de análisis**

La secuencia de análisis a ser utilizada debe estar diseñada de la siguiente manera: inicialmente se incluyen los blancos de reactivo y matriz, luego la curva en matriz, control de veracidad, control de especificidad, muestras, duplicados y fortificados. Se incluyen un control continuo de calibración cada 10 inyecciones y uno al finalizar la secuencia.

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las soluciones estándar en matriz, se grafica para cada plaguicida, su área en función de la concentración empleando el RIN 52. Para el rango lineal definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde “y” es el área del plaguicida y “x” la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se evalúa la linealidad de la curva de calibración de cada plaguicida, a partir del cálculo de residuales. Se considera un ajuste adecuado, si se obtienen valores de residuales menores al 20%.

12.3. Se comparan las señales de la muestra y el estándar, para identificar coincidencias en los tiempos de retención. Se admite una tolerancia máxima de ± 0.1 minuto, respecto a los tiempos de retención obtenidos para la curva de calibración en la misma secuencia de análisis. En los casos afirmativos, se registran las áreas correspondientes para cada plaguicida (RIN 50).

12.4. La concentración de cada plaguicida en el **extracto**, se calcula interpolando su área, en la curva de calibración correspondiente.

$$C_{\text{plaguicida i, extracto}}\ (\mu g/L) = \frac{(\text{Área}_{\text{plaguicida i, extracto}}) - b}{a}$$

Siendo i=Diuron, Atrazina desisopropil, Atrazina desetil, Trifluralina, Simazina, Hexaclorobenceno, Atrazina, Lindano, Diazinon, Metil Paratión, Clorpirifós metil, Alacloro, Heptacloro, Malatión, Aldrin, Heptacloro epóxido (isómero B), Captan, Fipronil, Clordano (Trans); o,p' DDE; Clordano (Cis), Endosulfán alfa, Dieldrin; p,p' DDE; o,p' DDD; Endrin, Endosulfán beta; p,p' DDD; o,p' DDT; Etión, Endosulfán sulfato; p,p' DDT; Trifloxystrobina, Fluroxipir, Metoxiclor, Mirex, Lambda-Cialotrina, Permetrina, Ciflutrina, Cipermetrina, Azoxiestrobina.

12.5. La concentración de cada plaguicida en la muestra, en µg/L, se calcula según:

$$C_{\text{plaguicida i, muestra}}\ (\mu g/L) = \frac{C_{\text{plaguicida i, extracto}} \times V\ \text{final}}{T\ \text{muestra}}$$

donde:

C plaguicida i, extracto: es la concentración de cada plaguicida, en µg/L, calculada según 12.3

V final: volumen final del extracto, en mL.

T muestra: toma de muestra, en g.

Se asume que la densidad de las muestras es de 1 g/mL.

Confirmación analítica

12.6. Para aquellos plaguicidas en los cuales las señales obtenidas sean mayores al límite de cuantificación, es necesario realizar la confirmación cromatográfica por una segunda columna de distinta polaridad. Verificar que las áreas de los plaguicidas confirmados sean comparables con los valores obtenidos en la etapa de cuantificación.

12.7. Para los casos en que no se logre una buena resolución de señales, es posible intercambiar las columnas en cuanto a su uso para cuantificación y confirmación.

12.8. La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{(C_{\text{plaguicida i, M AD}} - C_{\text{plaguicida i, M}}) \times V\ \text{final}}{[(V_{\text{Std Fort}} \times C_{\text{Std fort, plaguicida i}}) / V\ \text{final}\ ] \times T\ \text{muestra}}$$

donde:

C plaguicida i, M AD: concentración de cada plaguicida en la muestra adicionada, en µg/L, calculada según 12.4

C plaguicida i, M: concentración de cada plaguicida en la muestra sin adicionar, en µg/L

V Std Fort: volumen del estándar de fortificación 8.7.3 adicionado a la muestra, en µL

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Los datos correspondientes a los controles de calidad del batch se registran en el RIN 53-A o RIN 53-B (según los parámetros a analizar), correspondiente a la ruta de análisis.

13.1. **Control de blancos:**

En cada batch de extracción, se analiza un blanco de reactivos y un blanco de matriz, extraídos ambos en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Se utilizará agua desionizada (8.4) como blanco de reactivos y una muestra blanco de agua superficial. Verificar que los cromatogramas no contengan señales significativas, que interfieran con los compuestos de interés.

13.2. **Control de recuperación de fortificaciones:**

Se evalúa la recuperación de todos los analitos de interés, realizando el análisis de dos fortificados (a dos niveles distintos), cada 10 muestras y como mínimo 1 de cada nivel por batch. Los niveles que se evalúan son los correspondientes a los LOQ del scope (dilución del mix a 0.4 ppb y a 2 ppb).

Para ello, fortificar una muestra con la solución 8.10 u 8.11, según corresponda, de tal forma que la concentración final corresponda al límite de cuantificación. Calcular la recuperación de la adición según 12.8, la cual debe estar dentro del rango 60-140 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos. En caso de no cumplimiento, evaluar la posibilidad de informar utilizando límites de reporte.

13.3. **Control de veracidad de la determinación:**

Evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), utilizando un material de referencia certificado. Dicho control se prepara en forma análoga a los puntos de curva en matriz y a una concentración incluida dentro del rango de calibración. Se incluye como mínimo un control de veracidad por batch de extracción.

De ser posible, el material de referencia deberá incluir la totalidad de los plaguicidas a analizar. En los casos en que esto no sea posible, se evaluará la posibilidad de complementar el control de veracidad, con material de referencia de distinto origen al empleado en la curva de calibración.

La concentración obtenida para cada plaguicida debe estar en el rango 60-140% o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento analítico y evaluar la repetición del análisis del batch.

13.4. **Control continuo de calibración del equipo:**

El control de calibración es utilizado para poder identificar posibles cambios de sensibilidad durante la determinación analítica. Para ello se incluye un punto de curva de concentración intermedia cada 10 inyecciones y al final de la secuencia. Se acepta hasta un 20% de variación de la sensibilidad. Si se obtiene una diferencia de señal mayor al 20% respecto a la primera inyección del estándar (durante el análisis la curva en matriz), evaluar la repetición parcial o total del análisis cromatográfico.

13.5. **Control de precisión:**

Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch de muestras. Los límites de aceptación de los duplicados, surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 30%, para cada plaguicida.

13.6. **Control de especificidad:**

El control de especificidad es utilizado para permitir la visualización de los analítos de interés y corresponde a un punto de curva en solvente.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA Method 8081B Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography, Revisión 2, Febrero de 2007.

14.2. EPA Method 3510C Separatory funnel liquid-liquid extraction, Revisión 3, Diciembre de 1996.

14.3. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (Documento SANTE/11312/2021).

8090UY

Determinación de plaguicidas en matriz líquida por inyección directa utilizando Cromatografía Líquida acoplada a detector de masas tándem



Elaborado - R. Souza, V. Muñoz

Modificado - R. Souza

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de 80 plaguicidas en aguas naturales, efluentes industriales y otras matrices líquidas asimilables a las anteriores, establecidos en la Tabla 1. También se incluyen los rangos de trabajo y el límite de cuantificación (LOQ).

Tabla 1: Lista de plaguicidas incluidos en este procedimiento, incluyendo rango de trabajo y LOQ.

Name	**Nombre**	**Nº CAS**	**Rango de trabajo aguas (µg/L)**	**Límite de cuantificación aguas (µg/L)**	Rango de trabajo efluentes (µg/L)	Límite de cuantificación efluentes industriales (µg/L)
2,4-D	2,4-D	94-75-7	2,5-200	2,5	10-500	10
Acephate	Acefato	30560-19-1	1,0-200	1,0	10-500	10
Acetamiprid	Acetamiprid	135410-20-7	0,5-200	0,5	10-500	10
Alachlor	Alacloro	15972-60-8	0,5-200	0,5	10-500	10
Ametryn	Ametrina	834-12-8	0,5-200	0,5	10-500	10
Atrazine	Atrazina	1912-24-9	0,5-200	0,5	10-500	10
Atrazine-desethyl	Atrazina desetil	6190-65-4	0,5-200	0,5	10-500	10
Atrazine-desisopropyl	Atrazina desisopropil	1007-28-9	0,5-200	0,5	10-500	10
Azinphos-methyl	Azinfos metil	86-50-0	0,5-200	0,5	10-500	10
Azoxystrobin	Azoxiestrobina	131860-33-8	0,5-200	0,5	10-500	10
Bifenthrin	Bifentrina	82657-04-3	1,0-200	1,0	10-500	10
Bispiribac Na	Bispiribac sodio	125401-92-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Carbaryl (NAC)	Carbaril	63-25-2	0,5-200	0,5	10-500	10
Carbendazim	Carbendazim	10605-21-7	1,0-200	1,0	10-500	10
Carbofuran	Carbofurano	1563-66-2	0,5-200	0,5	10-500	10
Chlorantraniliprole	Clorantraniliprole	500008-45-7	1,0-200	1,0	10-500	10
Chlorpyrifos	Clorpirifos	2921-88-2	0,5-200	0,5	10-500	10
Chlorpyrifos-methyl	Clorpirifós Metil	5598-13-0	1-200	1	10-500	10
Cyhalofop-Butyl	Cialofop Butil	122008-85-9	1,0-200	1,0	10-500	10
Clomazone	Clomazone	81777-89-1	0,5-200	0,5	10-500	10
Cymoxanil	Cimoxanilo	57966-95-7	1-100	1	10-500	10
Cypermethrin	Cipermetrina	52315-07-8	-	-	25-500	25
Cyproconazole	Ciproconazol	94361-06-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Deltamethrin	Deltametrina	52918-63-5	1,0-200	1,0	10-500	10
Diazinon	Diazinon	333-41-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Diclosulam	Diclosulam	145701-21-9	1,0-200	1,0	10-500	10
Difenoconazole	Difenoconazol	119446-68-3	1,0-200	1,0	10-500	10
Diflubenzuron	Diflubenzuron	35367-38-5	1,0-200	1,0	10-500	10
Diuron (DCMU)	Diuron	330-54-1	1-200	1	10-500	10
Emamectin B1a + Emamectin B1b	Emamectin benzoato	155569-91-8	0,5-200	0,5	-	-
Endosulfan-sulfate	Endosulfan sulfato	1031-07-8	1-200	1	10-500	10
Epoxiconazole	Epoxiconazol	135319-73-2	0,5-200	0,5	10-500	10
Ethion	Etión	563-12-2	0,5-200	0,5	10-500	10
Fenazaquin	Fenazaquin	120928-09-8	0,5-200	0,5	10-500	10
Fipronil	Fipronil	120068-37-3	0,5-200	0,5	10-500	10
Flumetsulam	Flumetsulam	98967-40-9	0,5-200	0,5	10-500	10
Flumioxazin	Flumioxazin	103361-09-7	2,5-200	2,5	25-500	25
Fluroxypyr-1-methyl-heptylester	Fluroxipir 1-metilheptil ester	81406-37-3	1-200	1	10-500	10

Flutriafol	Flutriafol	76674-21-0	1,0-200	1,0	10-500	10
Fomesafen	Fomesafen	72178-02-0	2,5-200	2,5	25-500	25
Haloxyfop-methyl	Haloxifop metil	69806-40-2	1-200	1	10-500	10
Hexaconazole	Hexaconazol	79983-71-4	1,0-200	1,0	10-500	10
Imazalil	Imazalil	35554-44-0	0,5-200	0,5	10-500	10
Imazapyr	Imazapir	81334-34-1	1,0-200	1,0	10-500	10
Imidaclorpid	Imidacloprid	138261-41-3	1,0-200	1,0	10-500	10
Iprodione	Iprodione	36734-19-7	0,5-200	0,5	10-500	10
Isoxadifen-ethyl	Isoxadifen etil	163520-33-0	0,5-200	0,5	10-500	10
Kresoxim-methyl	Kresoxim metil	143390-89-0	0,5-200	0,5	10-500	10
Lambda Cyhalothrin	Lambda Cialotrina	91465-08-6	5,0-200	5,0	25-500	25
Linuron	Linuron	330-55-2	1-200	1	10-500	10
Malaoxon	Malaoxon	1634-78-2	0,5-200	0,5	10-500	10
Malathion	Malatión	121-75-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Metalaxyl	Metalaxil	57837-19-1	0,5-200	0,5	10-500	10
Methidathion	Metidation	950-37-8	5-200	5	10-500	10
Methiocarb	Metiocarb	2032-65-7	0,5-200	0,5	10-500	10
Methoxyfenozide	Metoxifenocida	161050-58-4	0,5-200	0,5	10-500	10
Metolachlor	Metolacloro	51218-45-2	0,5-200	0.5	10-500	10
Metribuzin	Metribuzina	21087-64-9	0,5-200	0,5	10-500	10
Metsulfuron-methyl	Metsulfuron metil	74223-64-6	0,5-200	0,5	10-500	10
Permethrin	Permetrina	52645-53-1	5,0-200	5,0	10-500	10
Picoxystrobin	Picoxistrobin	117428-22-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Pirimiphos-methyl	Pirimifos metil	29232-93-7	0,5-200	0,5	10-500	10
Prochloraz	Procloraz	67747-09-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Profenofos	Profenofos	41198-08-7	0,5-200	0,5	10-500	10
Propamocarb	Propamocarb	24579-73-5	0,5-200	0,5	10-500	10
Propanil	Propanil	709-98-8	1-200	1	10-500	10
Propaquizafop	Propaquizafop	111479-05-1	1,0-200	1,0	10-500	10
Propiconazole (stereo isomer)	Propiconazol	60207-90-1	0,5-200	0,5	10-500	10
Pyraclostrobin	Piraclostrobina	175013-18-0	0,5-200	0,5	10-500	10
Pyrazosulfuron-ethyl	Pirazosulfuron etil	93697-74-6	0,5-200	0,5	10-500	10
Pyrimethanil	Pirimetanil	53112-28-0	0,5-200	0,5	10-500	10
Simazine	Simazina	122-34-9	0,5-200	0,5	10-500	10
Tebuconazole	Tebuconazol	107534-96-3	0,5-200	0,5	10-500	10
Terbacil	Terbacil	5902-51-2	5-200	5	10-500	10
Thiabendazole	Tiabendazol	148-79-8	1-200	1	10-500	10
Thiametoxam	Tiametoxam	153719-23-4	1,0-200	1,0	10-500	10
Tricyclazole	Triciclazol	41814-78-2	5-200	5	10-500	10
Trifloxystrobin	Trifloxiestrobina	141517-21-7	0,5-200	0,5	10-500	10
Triflumuron	Tirflumuron	64628-44-0	1,0-200	1,0	10-500	10
Triticonazole	Triticonazol	131983-72-7	0,5-200	0,5	10-500	10

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del Cromatógrafo Liquido con detector de masas tándem triple cuadupolo Shimadzu 8050 (INE 139).

2.6. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121)

2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 07, INE93, INE 153).

2.8. Ruta para el análisis de plaguicidas en aguas naturales por inyección directa (RIN 55).

2.9. Ruta de preparación de soluciones madres estándares ((RIN 35).

2.10. Ruta de preparación de Mixes (RIN 45).

2.11. REGISTRO de masa de SOLUCIONES MADRE Y MIXES (RIN 51).

2.12. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.13. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El presente método describe el análisis simultáneo de los compuestos de la Tabla 1, mediante la dilución de la muestra con el solvente adecuado, filtrado e inyección directa, en el cromatógrafo líquido con detector de espectrometría de masas tándem.

3.2. La cuantificación de cada plaguicida, se realiza por interpolación del área en la curva de calibración en la matriz correspondiente, utilizando para ello la señal de la transición de mayor sensibilidad.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes para las actividades vinculadas al análisis.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. Todos los solventes se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

5.1. En caso de presentarse una interferencia por parte de la matriz, que coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (de cuantificación o confirmación) se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación.

5.2. Para el caso de muestras con alta carga de matriz, del tipo efluentes industriales o asimilables, es posible aumentar el factor de dilución en la preparación previo a la inyección.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un frasco de 1 L de vidrio ámbar, previamente enjuagado con hexano y acetona, con contratapa de teflón enjuagada con acetona (o papel aluminio).

6.2. Preservar las muestras a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). El tiempo máximo de almacenamiento son 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo líquido con detector de espectrometría de masas tándem (triple cuadrupolo) SHIMADZU 8050. En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares, que permita las prestaciones definidas en este documento.

7.2. Columna cromatografía: Shim pack Velox C18 1.8 µm, 2.1 x 100 mm o similar.

7.3. Generador de Nitrógeno.

7.4. Balanza de resolución 0,00001 g y 0,001 g

7.5. Matraces aforados de 5,00 y 10,00 mL.

7.6. Vórtex.

7.7. Jeringa de vidrio o descartable de plástico, de 5mL.

7.8. Viales de vidrio de 2, 4 y 12 mL con tapa rosca y septo de PTFE.

7.9. Tubos plásticos de 2, 10, 15 y 50 mL.

7.10. Pipetas automáticas regulable de 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

7.11. Filtro de cartucho de PVDF 0,22 µm.

7.12. Desionizador de agua (Millipore Elix Escentials o similar)

8. REACTIVOS

8.1. Acetonitrilo calidad HPLC (Baker, Mallinckrodt o similar, Nro. CAS 75-05-8).

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

8.3. Acido Fórmico calidad HPLC (Baker, Mallinckrodt o similar Nro. CAS 64-18-6).

8.4. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la Tabla 1 del presente documento.

8.5. Solución stock madre individual de cada plaguicida (concentración aproximada 1000 mg/L): Preparar según PGC 22, Procedimiento de preparación de soluciones de referencia para el análisis multiresiduos de plaguicidas.

8.6. Solución stock mix de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 1000 µg/L): Preparar según PGC 22, Procedimiento de preparación de soluciones de referencia para el análisis multiresiduos de plaguicidas.

8.7. Argón de alta pureza (Ar Nro. CAS 7440-37-1; 99,99 %).

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. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.

9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, tanto para la toma de muestra, como para las demás etapas del análisis, debe enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona, libres de plaguicidas. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.

9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas, deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

9.4. Control de peso de soluciones estándar: Para las soluciones mencionadas en los puntos 8.5 y 8.6, realizar control de peso antes de usar. Se admite una diferencia de peso máxima de 1% respecto al último valor registrado. En caso de superar este valor, se evaluará la posibilidad de reconstituir al volumen inicial o preparar nuevamente. Luego de utilizar la solución, se registra su nuevo peso en el RIN 51. Este valor es utilizado para la verificación de la solución antes del próximo uso.

Puntos críticos en el análisis de muestras

9.5. Evitar evaporar a sequedad en el proceso de concentración del extracto mediante rotavapor.

9.6. En la etapa de concentración por evaporación con arrastre de N_2, es importante interrumpir el proceso de concentración inmediatamente después de que la muestra llegue a sequedad.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Para preparar las curvas de calibración en matriz, se realiza el procedimiento de preparación de muestra utilizando agua bruta libre de los analitos de interés y se agrega la cantidad apropiada de un mix de plaguicidas (8.6) o diluciones del mismo en concentraciones crecientes (n = 5) de acuerdo con los rangos de trabajo establecidos en la Tabla 1 y de manera que el punto más bajo de la curva de calibración, corresponda al límite de reporte y/o límite de cuantificación. De igual manera preparar un cero de curva, a partir de la muestra blanco y acetonitrilo. Siempre se debe mantener la relación muestra: acetonitrilo en una relación 1:1. En caso de que la matriz empleada para realizar la calibración contenga los analitos de interés, se deberán cuantificar las muestras empleando el método de adiciones estándar. La curva de Matrix Match debe contener como mínimo de 3 niveles de concentración.

Tabla 2. Esquema de preparación de curva de calibración Matrix Match.

Nivel de concentración µg/L	Volumen de muestra (µL)	Concentración Mix Estándares), (µg/L)	Volumen de Mix Estándares (µL)	Volumen de Acetonitrilo (µL)
0.25	500	10	25	475
0.5	500	10	50	450
2.5	500	100	25	475
5	500	100	50	450
10	500	100	100	400
25	500	1000	25	475
50	500	1000	50	450
75	500	1000	75	425
100	500	1000	100	400

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

11.1. Las muestras de aguas se analizan sin diluir, para las muestras de efluentes es necesario realizar una dilución de las mismas 1/5 con agua (8.2), en un tubo de 15 mL (7.9).

11.2. Homogeneizar bien la muestra.

11.3. Tomar 500 µL de muestra en un tubo plástico de volumen adecuado y adicionar 500 µL de acetonitrilo. Es posible tomar una porción mayor de muestra si se manteniendo la relación de muestra: acetonitrilo.

11.4. Seguidamente se agita en vortex durante 30 segundos y se filtra mediante filtro de 0,22 µm y jeringa (7.7) a un vial de 2 mL.

11.5. Inyectar en el Cromatógrafo. La secuencia de inyección deberá estar diseñada de la siguiente manera: un estándar preparado en solvente, curva de calibración en Matriz, muestras, muestras de controles de calidad y nuevamente la curva de calibración.

Análisis cromatográfico

11.6. Prender el cromatógrafo SHIMADZU 8050 UHPLC-MS/MS. Seleccionar el método Plaguicidas2024 y verificar que las condiciones de este sean las descriptas a continuación:

Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	98	2
Tiempo de corrida: 17 minutos	0.5	50	50
	2.5	45	55
	5.5	25	75
	7.5	15	85
	8.3	0	100
	13	0	100
	13.3	98	2
	17	98	2

* Inyección:	Volumen inyección del método: 1.5 µL (según el modo de inyección programado, determina un volumen final de 6 µL de muestra)
* Columna:	Shim pack Velox C18 1.8 µm, 2.1 x 100 mm. Temperatura: 40 °C.
*Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C.

*Parámetros del detector MS/MS para cada plaguicida a ser determinado. Ver tabla 3.

Tabla 3. Parámetros del detector MS/MS

Nombre	Polaridad	Ión precursor (m/z)	Ión producto 1 (m/z)	Ión producto 2 (m/z)	Ión producto 3 (m/z)	Transición 1 Q1 Pre Bias	Transición 1 CE	Tarnsición 1 Q3 Pre Bias	Transición 2 Q1 Pre Bias	Transición 2 CE	Tarnsición 2 Q3 Pre Bias	Transición 3 Q1 Pre Bias	Transición 3 CE	Tarnsición 3 Q3 Pre Bias
Acefato	+	184	143	49,15		-20	-10	-27	-20	-22	-19			
Imazapir	+	262,3	217,2	69,1		-20	-20,3	-20	-20	-28,1	-24			
Propamocarb	+	189,2	102,15	144,2		-18	-8	-19	-18	-14	-15			
Metsulfuron Metil	+	382,1	167,15	199		-14,8	-17,4	-14,8	-28,7	-22,2	-18,6			
Tiametoxam	+	292	181,1	211,1		-15	-22	-18	-15	-13	-22			
Desisopropil-Atrazina	+	174,1	68,15	104		-20	-29	-26	-20	-23	-20			
Flumetsulam	+	326,1	129,1	109		-17	-27	-25	-17	-40	-18			
Imidacloprid	+	256,15	209,15	175,2		-13	-16	-21	-13	-21	-17			
Acetamiprid	+	223,1	126,1	55,95		-26	-11	-24	-26	-16	-22			
Cimoxanilo	+	199,1	111,15	128,15		-23	-19	-18	-23	-9	-23			
Desetil-Atrazina	+	188,1	146,1	104,05		-22	-18	-30	-22	-24	-19			
Carbendazim	+	192,1	160,2	132,2		-22	-19	-30	-22	-30	-25			
Pirazosulfuron Etil	+	415,1	182	139,05		-12	-10	-19	-12	-42	-27			
Diclosulam	+	406,1	161	378		-12	-27	-28	-12	-15	-26			
Triciclazol	+	190,1	136	109		-22	-24	-24	-22	-36	-21			
N-(2,4-Dimethylphenyl) formamide	+	150,1	107,1	106,1		-16	-21	-19	-16	-30	-19			
Tiabendazol	+	202	175	131,15		-22	-15	-18	-22	-27	-24			
Metribuzina	+	215,1	187,1	49,1		-23	-18	-19	-23	-26	-19			
Carbofurano	+	222,1	165	77,15		-25	-6	-17	-25	-44	-30			
Malaoxon	+	315,1	98,9	127,15		-16	-14	-18	-16	-7	-23			
Simazina	+	202,1	104	68,05		-23	-25	-19	-23	-32	-27			
Carbaril	+	202,1	145,1	117		-22	-12	-28	-22	-25	-22			
Bispiribac Na	+	453,1	297,2	179,05		-17	-19	-19	-17	-23	-17			
Fomesafen	+	456	344	223,05	300	-14	-15	-24	-14	-30	-15	-14	-26	-21
Atrazina	+	216,1	174,1	104,05		-24	-13	-18	-24	-30	-20			
Flutriafol	+	302,1	70,1	123		-15	-22	-28	-15	-26	-22			
Diuron	+	233	72,1	46,15		-26	-8	-27	-26	-17	-18			
Metalaxyl	+	280,1	220	192,05		-14	-6	-22	-14	-13	-20			
Metidation	+	320	145	84,9		-16	-12	-27	-16	-27	-15			

Nombre	Polaridad	Ión precursor (m/z)	Ión producto 1 (m/z)	Ión producto 2 (m/z)	Ión producto 3 (m/z)	Transición 1 Q1 Pre Bias	Transición 1 CE	Tarnsición 1 Q3 Pre Bias	Transición 2 Q1 Pre Bias	Transición 2 CE	Tarnsición 2 Q3 Pre Bias	Transición 3 Q1 Pre Bias	Transición 3 CE	Tarnsición 3 Q3 Pre Bias
Azinfos Metil	+	318	132,05	76,95		-16	-16	-28	-16	-36	-29			
Clorantraniliprole	+	483,9	452,9	285,9		-14	-19	-22	-14	-17	-30			
Clomazone	+	239,9	125	89		-12	-11	-23	-12	-48	-16			
Flumioxazin	+	355,05	327	299,05		-16	-10	-22	-16	-43	-25			
Ametrina	+	228,1	186	68		-12	-9	-19	-12	-40	-27			
Linuron	+	248,8	160	182,05		-12	-18	-30	-12	-16	-18			
Propanil	+	218	161,95	127		-24	-14	-17	-24	-24	-25			
Azoxistrobina	+	404	371,95	328,95		-18	-5	-27	-18	-26	-23			
Pirimetanil	+	200,1	107	77,1		-21	-24	-19	-21	-44	-30			
Metiocarb	+	226,1	121,1	169,05		-26	-19	-23	-26	-10	-17			
Malation	+	331,05	127,05	285,1	125	-26,2	-13,3	-11,1	-24,9	-8,3	-17,4	-26,2	-27,5	-21,1
Metoxyfenozide	+	369,2	149,15	312,95		-19	-8	-30	-19	-9	-21			
Ciproconazol	+	292,1	70,05	125,05		-15	-22	-28	-15	-32	-23			
Alaclor	+	270,1	238	162,15		-14	-11	-16	-14	-21	-30			
Iprodiona	+	330,05	121,1	101,1		-9,8	-21,9	-9,8	-24,9	-36	-37,5			
Epoxiconazol	+	330	121,1	101,1		-17	-11	-22	-17	-44	-19			
Triticonazol	+	318,1	70,15	125		-16	-22	-28	-16	-28	-23			
Metolaclor	+	284,1	252,05	134,15		-14	-6	-17	-14	-32	-24			
Diflubenzuron	+	311	158,1	141,05		-16	-16	-29	-16	-32	-27			
Isoxadifen Etil	+	296,1	232	263		-15	-12	-24	-15	-12	-28			
Picoxistrobina	+	368	145,1	205		-19	-12	-28	-19	-5	-21			
Kresoxim Metil	+	314,1	267	116,15		-16	-8	-18	-16	-22	-22			
Tebuconazol	+	308,2	70,05	125,05		-16	-22	-28	-16	-38	-23			
Imazalil	+	297,1	159,05	41,1	200,85	-15	-23	-16	-15	-31	-16	-15	-19	-20
Diazinon	+	305,1	169,1	153		-16	-12	-17	-16	-16	-29			
Propiconazol	+	342	158,9	69,1		-17	-28	-16	-17	-22	-27			
Piraclostrobina	+	388	194,1	164,05		-21	-8	-21	-21	-19	-30			
Hexaconazol	+	314,1	70	159		-16	-22	-27	-16	-30	-30			
Triflumuron	+	359,1	156,05	139,05		-14	-17	-26	-14	-34	-23			
Pirimifos Metil	+	306,1	164,1	66,95		-17	-18	-17	-17	-40	-27			

Nombre	Polaridad	Ión precursor (m/z)	Ión producto 1 (m/z)	Ión producto 2 (m/z)	Ión producto 3 (m/z)	Transición 1 Q1 Pre Bias	Transición 1 CE	Tarnsición 1 Q3 Pre Bias	Transición 2 Q1 Pre Bias	Transición 2 CE	Tarnsición 2 Q3 Pre Bias	Transición 3 Q1 Pre Bias	Transición 3 CE	Tarnsición 3 Q3 Pre Bias
Clorpirifos Metil	+	324	125,1	291,7		-17	-21	-22	-17	-16	-30			
Procloraz	+	376	307,95	70		-11	-8	-21	-11	-26	-29			
Difenoconazol	+	406,1	250,9	111		-12	-25	-17	-12	-55	-21			
Cialofopo Butil	+	375,2	120	256		-18	-32	-21	-18	-16	-18			
Trifloxistrobina	+	409,1	186,1	145,1	205,9	-20	-6	-19	-20	-29	-29	-20	-10	-21
Haloxifop Metil	+	376,1	316	91,05	271,95	-11	-8	-22	-11	-27	-16	-11	-36	-28
Profenofos	+	375	304,7	346,75		-11	-19	-21	-11	-13	-24			
Propaquizafop	+	444,1	70,2	100,2		-21	-22	-20	-21	-42	-28			
Emamectina Benzoato B1b	+	872,2	158,2	82,05		-26	-37	-16	-26	-55	-13			
Etion	+	385	143	198,9		-20	-25	-28	-20	-10	-20			
Clorpirifos	+	350,05	197,95	97,1		-17,4	-23,4	-18,6	-26,2	-28,8	-37,5			
Fluroxypyr-1-methyl-heptylester	+	367,1	254,95	209		-11	-12	-26	-11	-24	-21			
Emamectina Benzoato B1a	+	886,4	158,2	82,05		-26	-31	-30	-26	-55	-16			
Lambda Cialotrina	+	467,1	225,1	450	141,05	-13	-18	-24	-13	-11	-16	-13	-45	-29
Cipermetrina	+	432,9	191	416		-22	-15	-19	-22	-9	-30			
Deltametrina	+	523	281	505,9		-26	-17	-29	-26	-11	-36			
Fenazaquin	+	307,2	57	161,1		-16	-13	-23	-16	-12	-16			
Permetrina	+	408,1	183,1	355,05		-12	-21	-19	-12	-10	-26			
Bifentrina	+	440,2	181,15	165,1		-13	-17	-19	-13	-55	-30			
2,4-D	-	219,2	161	125,1		15	14	15	15	27	24			
Terbacil	-	215,1	159,1	42,15		15	16	30	15	27	15			
Fipronil	-	435	330	250,05		16	16	24	16	27	27			
Endosulfan sulfato	-	418,8	97,05	97		30	22	20	16	35	19			

• El voltaje de la interface puede variar de acuerdo al tunning del equipo

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación utilizando el detector de triple cuadrupolo

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada plaguicida, su área en función de la concentración. Para el rango de trabajo definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde "y" es el área del plaguicida y "x" la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L. Podrán utilizarse opciones de algoritmos de ponderación del Software del equipo, como 1/Concentración para obtener una mejor regresión lineal.

12.2. Se comparan los cromatogramas de muestra y estándar, y en caso de presunto positivo, se evalúan los requerimientos cromatográficos y de espectrometría de masas, establecidos en el Guía DG-SANTE vigente para la identificación del mismo. Ver PGC 01 sección "Criterios de identificación de compuestos para métodos multiresiduos por LC MS/MS"

12.3. La concentración de cada plaguicida en la muestra, se calcula interpolando el área en el cromatograma de la muestra, en la curva de calibración en matriz correspondiente.

$$C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra dil (µg/L)} = \frac{(\text{Área}_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra dil}) - b}{a}$$

donde:

i= analito de interés.

a y b corresponden a la pendiente y ordenada en el origen respectivamente de la recta de mejor ajuste.

12.4. La concentración de cada plaguicida en la muestra, en µg/L, se calcula según (ajuste por el paso de dilución en la preparación):

$$C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra (µg/L)} = \frac{C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra dil} \times 1000}{500}$$

donde:

C plaguicida i, muestra dil: es la concentración de cada plaguicida, en µg/L, calculada según 12.3

12.5. La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{(C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra fortificada µg/L} * \text{Vol final muestra fortificada mL}) - (C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra µg/L} * \text{Vol muestra mL})}{(C_{\text{plaguicida i}}\ \text{estándar de fortifivación µg/L} * \text{Vol estándar mL})}$$

donde:

Cplaguicida i, muestra fortificada: Concentración de la plaguicida i calculada según 12.4, en la muestra fortificada.

Cplaguicida i, muestra: Concentración de la plaguicida i en la muestra sin fortificar, calculada según 12.4.

Cplaguicida i, estándar fortificación: Concentarción del estándar utilizado para la fortificación.

Vol final muestra fortificada: Volumen final de muestra fortificada.

Vol muestra: Volumen de muestra sin fortificar utilizado en la fortificación.

Vol estándar: Volumen de estándar agregado a la muestra fortificada.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de veracidad del método:**

Evaluar la veracidad de la determinación, realizando una fortificación de una muestra perteneciente al batch, al nivel del límite de cuantificación o reporte del analito de interés, cada 5 muestras de aguas y por cada muestra de efluentes. Para el caso de batch de análisis menores a 5 muestras, se deberá realizar como mínimo un fortificado.

El porcentaje de recuperación calculado deberá estar entre 60-140 %.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

Modo de preparación: En un tubo plástico realizar una toma de 500 µL de la muestra a fortificar y adicionar un volumen adecuado de Solución stock mix de plaguicidas (8.6) o una dilución del mismo. Se adicionan 500 µL de ACN. Agitar en vortex durante 30 segundos y luego filtrar mediante filtro de 0,22 µm y jeringa (7.7) a un vial de 2 mL.

13.2. **Control de precisión de la determinación:**

Se debe realizar un análisis por duplicado cada 5 muestras de aguas y por cada muestra de efluentes. Para el caso de batch de análisis menores a 5 muestras, se deberá realizar un análisis por duplicado. La dispersión relativa estándar expresada en forma porcentual (RSD) deberá ser menor o igual a 20 %.

En caso de no cumplir, evaluar la repetición del análisis.

13.3. **Control de blancos:**

En cada corrida, se analiza un blanco de reactivos y uno de matriz extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que el cromatograma blanco no contenga señales que interfieran con los compuestos de interés.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA Method 538, Determination of selected organic contaminants in drinking water by direct aqueous injection -Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (DAI-LC/MS/MS), EPA Document #: EPA/600/R-09/149, versión 1, Noviembre 2009.

14.2. European commission directorate-general for health and food safety. "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed" (SANTE 11312/2021).

14.3. Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed, GAC/GL 90-2017, adopted in 2017. FAO CODEX

14.4. Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. L. Pareja, M.J. Martínez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen and A.R. Fernández-alba, J. Chromatogr. A, 1218, 4790 (2011).

8091UY

Determinación de plaguicidas en peces

Extracción de plaguicidas mediante método QuEChERS y posterior determinación por cromatografía líquida acoplada a detectores de masas tándem (LC-MS/MS)

Elaborado - R. Souza

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de 68 plaguicidas en muestras de pez entero, en los rangos de trabajo especificados a continuación (sujeto a disponibilidad de estándares):

Tabla 1- Listado de plaguicidas incluidos en la presente metodología analítica.

Name	Nombre	Nº CAS	Límite de cuantifi-cación (µg/kg)	Rango de trabajo (µg/Kg)
Acetamiprid	Acetamiprid	135410-20-7	0,5	0,5-30
Alachlor	Alacloro	15972-60-8	0,5	0,5-30
Ametryn	Ametrina	834-12-8	0,5	0,5-30
Atrazine	Atrazina	1912-24-9	0,5	0,5-30
Atrazine-desethyl	Atrazina desetil	6190-65-4	0,5	0,5-30
Atrazine-desisopropyl	Atrazina desisopropil	1007-28-9	0,5	0,5-30
Azinphos-methyl	Azinfos metil	86-50-0	0,5	0,5-30
Azoxystrobin	Azoxiestrobina	131860-33-8	0,5	0,5-30
Bifenthrin	Bifentrina	82657-04-3	0,5	0,5-30
Carbaryl (NAC)	Carbaril	63-25-2	0,5	0,5-30
Carbofuran	Carbofurano	1563-66-2	0,5	0,5-30
Carbendazim	Carbendazim	10605-21-7	0.5	0,5-30
Chlorantraniliprole	Clorantraniprol	500008-45-7	0,5	0,5-30
Chlorpyrifos	Clorpirifos	2921-88-2	0,5	0,5-30
Chlorpyrifos-methyl	Clorpirifós Metil	5598-13-0	0,5	0,5-30
Cypermethrin	Cipermetrina	52305-07-8	0,5	0,5-30
Clomazone	Clomazone	81777-89-1	0,5	0,5-30
Cyhalofop-butyl	Cihalofop-butil	122008-85-9	0,5	0,5-30
Cymoxanil	Cimxanilo	57966-95-7	0,5	0,5-30
Cyproconazole	Ciproconazol	94361-06-5	0,5	0,5-30
Deltamethrin	Deltametrina	52918-63-5	0,5	0,5-30
Diazinon	Diazinon	333-41-5	0,5	0,5-30
Difenoconazole	Difenoconazol	119446-68-3	0,5	0,5-30
Diflubenzuron	Diflubenzuron	35367-38-5	0,5	0,5-30
Diuron (DCMU)	Diuron	330-54-1	0,5	0,5-30
Endosulfan-sulfate	Endosulfan sulfato	1031-07-8	0,5	0,5-30
Epoxiconazole	Epoxiconazol	135319-73-2	0,5	0,5-30
Ethion	Etión	563-12-2	0,5	0,5-30
Fenazaquin	Fenazaquin	120928-09-8	0,5	0,5-30
Fipronil	Fipronil	120068-37-3	0,5	0,5-30
Flumioxazin	Flumioxazin	103361-09-7	0,5	0,5-30
Fluroxypyr-1-methylheptylester	Fluroxypyr-1-methylheptylester	81406-37-3	0,5	0,5-30
Flutriafol	Flutriafol	76674-21-0	0,5	0,5-30
Haloxyfop-methyl	Haloxifop metil	69806-40-2	0,5	0,5-30
Hexaconazole	Hexaconazol	79983-71-4	0,5	0,5-30
Imazalil	Imazalil	35554-44-0	0,5	0,5-30
Imidacloprid	Imidacloprid	138261-41-3	0,5	0,5-30
Iprodione	Iprodione	36734-19-7	0,5	0,5-30
Name	Nombre	Nº CAS	Límite de cuantifi-cación (µg/kg)	Rango de trabajo (µg/Kg)
Isoxadifen-ethyl	Isoxadifen etil	163520-33-0	0,5	0,5-30
Kresoxim-methyl	Kresoxim metil	143390-89-0	0,5	0,5-30
Lambda Cyahlothrin	Lambda Cialotrina	91465-08-6	5,0	5,0-30

Linuron	Linuron	330-55-2	0,5	0,5-30
Malaoxon	Malaoxon	1634-78-2	0,5	0,5-30
Malathion	Malatión	121-75-5	0,5	0,5-30
Metalaxyl	Metalaxil	57837-19-1	0,5	0,5-30
Methidathion	Metidation	950-37-8	0,5	0,5-30
Methiocarb	Metiocarb	2032-65-7	0,5	0,5-30
Methoxyfenozide	Metoxifenocida	161050-58-4	0,5	0,5-30
Metolachlor	Metolacloro	51218-45-2	0,5	0,5-30
Metribuzin	Metribuzina	21087-64-9	0,5	0,5-30
Permethrin	Permetrina	52645-53-1	0,5	0,5-30
Picoxystrobin	Picoxistrobin	117428-22-5	0,5	0,5-30
Pirimiphos-methyl	Pirimifos metil	29232-93-7	0,5	0,5-30
Prochloraz	Procloraz	67747-09-5	0,5	0,5-30
Profenofos	Profenofos	41198-08-7	0,5	0,5-30
Propaquizafop	Propaquizafop	111479-05-1	0,5	0,5-30
Propanil	Propanil	709-98-8	0,5	0,5-30
Propiconazole (stereo isomer)	Propiconazol	60207-90-1	0,5	0,5-30
Pyraclostrobin	Piraclostrobina	175013-18-0	0,5	0,5-30
Pyrimethanil	Pirimetanil	53112-28-0	0,5	0,5-30
Simazine	Simazina	122-34-9	0,5	0,5-30
Tebuconazole	Tebuconazol	107534-96-3	0,5	0,5-30
Terbacil	Terbacil	5902-51-2	0,5	0,5-30
Thiamethoxam	Tiametoxam	153719-23-4	0,5	0,5-30
Tricyclazole	Triciclazol	41814-78-2	0,5	0,5-30
Thiabendazole	Tiabendazol	148-79-11	0,5	0,5-30
Trifloxystrobin	Trifloxiestrobina	141517-21-7	0,5	0,5-30
Triflumuron	Triflumuron	64628-44-0	0,5	0,5-30
Triticonazole	Triticonazol	131983-72-7	0,5	0,5-30

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del cromatógrafo liquido acoplado a detector de masas tándem Shimadzu 8050 (INE 139).
2.6. Instructivos de uso de balanzas (según corresponda INE 06, INE 07, INE 93 o INE 115)
2.7. Ruta para la preparación de soluciones madre (RIN 35)
2.8. Ruta de análisis de plaguicidas en matrices solidas (RIN 57)
2.9. Registro de masa de Soluciones madre y mixes (RIN 51)
2.10. Ruta para la preparación de soluciones mix (RIN 45)
2.11. Instructivo de uso de centrífuga Eppendorf 5810 (Rotor A-4-81) (INE 124)
2.12. Instructivo de uso de concentrador de muestras Labconco modelo RapidVap (INE 127)
2.13. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121)
2.14. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108)
2.15. Instructivo de uso de mufla (INE 27)
2.16. Instructivo de uso de estufa (INE 107, INE 101)
2.17. Instructivo para el uso del destilador (INE 109)
2.18. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizadas en el laboratorio ambiental de DINACEA. (ES01)
2.19. Procedimiento de Limpieza de Material (PR 16)
2.20. Instructivo de uso del molino de cuchillas RESCH GM200 (INE 148)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los plaguicidas son extraídos de la matriz peces utilizando acetonitrilo como solvente extractante. El proceso es asistido por agitación mecánica, cloruro de sodio y sulfato de magnesio. La separación de fases es favorecida por centrifugación. Finalmente, el extracto es purificado mediante extracción en fase solida dispersiva con sulfato de magnesio, octadecilsilano (RP C-18) y primary and secondary amines (PSA).
3.2. Los analítos se determinan por cromatografía líquida con detector de masas tándem (LC-MS/MS).
3.3. La cuantificación de cada plaguicida, se realiza por interpolación del área de la señal cromatográfica, en la curva de calibración correspondiente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes para la manipulación de la muestra.
4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El detector empleado en el presente método es altamente selectivo. A pesar de esto los co-extractivos de la matriz pueden producir interferencias que alteran la señal. El uso de calibración con matriz disminuye los errores producto de esta interferencia. Sin embargo se recomienda poner especial énfasis en la etapa de purificación del extracto para evitar potenciales errores en la calibración y preservar el sistema instrumental.
5.2. En caso de que una interferencia por parte de la matriz, coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (cuantificación o confirmación) y tenga un efecto tal que no pueda ser disminuido con el uso de curva en matriz, se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación, establecidos en el PGC01 Procedimiento de validación de técnicas.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 50 g de muestra en papel aluminio y bolsa de nylon. Conservar a 4º C hasta el arribo de las mismas al laboratorio.
6.2. Preservar las muestras congeladas a – 20º C hasta la fecha de análisis. El tiempo máximo de almacenamiento es de 21 días para la extracción.

Nota 1: En los casos en que no se pudiera llegar a la cantidad de muestra solicitada, esta nunca debe de ser menor a 20g.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo líquido acoplado a detector de masas tándem marca Shimadzu, modelo 8050.
7.2. Columna cromatográfica Shimadzu Shim pack Velox C18 1.8 µm 2.1 x 100 mm o similar
7.3. Balanza de resolución 0,001 g (IN 594 ó IN 20).
7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (FQ 417).
7.5. Viales de vidrio ámbar de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.
7.6. Viales de vidrio ámbar de 12 mL con tapa rosca, con contratapa de PTFE.
7.7. Insertos cónicos de vidrio de 300 µL, compatibles con viales de 2 mL.
7.8. Pipetas automáticas de 100, 1000 y 10000 µL.
7.9. Desionizador Millipore Elix Escentials (FQ 605).
7.10. Tubos tipo Falcon de 15 y 50 mL con tapa rosca.

7.11. Centrífuga con adaptadores para tubos de 50 y 15 mL (MB 609).
7.12. Vortex.
7.13. Pipetas pasteur de vidrio.
7.14. Concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2 (IN 610).
7.15. Tubos de vidrio con fondo cónico para concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2.
7.16. Jeringa de vidrio o descartable de plástico de 2 mL.
7.17. Filtro de cartucho de PVDF de 0,22 µm de diámetro de poro, hidrofílico.
7.18. Molino de cuchillas RESTSCH GM200 (IN 689)
7.19. Mufla (FQ 146)

8. REACTIVOS

8.1. Acetonitrilo calidad HPLC (Nro. CAS 75-05-8).
8.2. Acetato de etilo grado plaguicida (Nro. CAS 141-78-6).
8.3. Hexano libre de plaguicida (Nro. CAS 110-54-3).
8.4. Acetona libre de plaguicida (Nro. CAS 67-64-1).
8.5. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
8.6. Metanol grado plaguicida (Nro. CAS 67-56-1).
8.7. Sulfato de magnesio anhidro calidad ppa (Nro. CAS 7487-88-9).
8.8. Cloruro de sodio calidad ppa (Nro. CAS 7647-14-5).
8.9. Primary and secondary amines (PSA) (Nro. CAS 111-39-7).
8.10. Octadecil Silano (C18) (Nro. CAS 71889-02-6).
8.11. Formiato de amonio (Nro. CAS 540-69-2).
8.12. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la Tabla 1 del presente documento.
8.13. Solución stock de cada plaguicida (concentración aproximada 1000 mg/L): Se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.12.
8.14. Solución stock mix de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 10 mg/L): Se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.13.
8.15. Solución de fortificación de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida de 100 µg/L), preparada a partir de 8.14.
8.16. Nitrógeno (pureza 99.9%).
8.17. Argón de alta pureza (pureza 99.998%).
8.18. Detergente no alcalino para limpieza Extran o similar.

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la contaminación cruzada de la muestras durante la manipulación.
9.2. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas, deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.
9.3. Todo el material que será utilizado para la etapa de extracción y purificación debe ser lavado con agua y detergente no alcalino, y enjuagarse previo a su uso, con acetona libre de plaguicidas. El material de vidrio debe de ser muflado previo a su uso. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.
9.4. Restos de jabón (dodecil sulfato de sodio): genera un pH básico en la superficie del material de vidrio, el cual puede degradar parcialmente algunos analítos incluidos en el alcance (especialmente compuestos organofosforados).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La calibración se realiza mediante una curva preparada en matriz (Matrix Match Calibration) a fin de compensar el efecto de la misma sobre los plaguicidas de interés. Realizar la extracción de al menos 2 porciones de una matriz blanco, en forma análoga a las muestras. En la etapa de reconstitución del extracto final se agrega la cantidad correspondiente de solución mix de plaguicidas (8.12) o una dilución, empleando pipetas (7.8), de manera de obtener distintas concentraciones que cubran todo el rango lineal. En todos los casos se mantiene el volumen final de 1 mL. En el caso de preparar diluciones de la solución mix, estas deben ser preparadas al momento de ser utilizadas. La curva debe contar con al menos 3 puntos y la vigencia de la misma es de 1 mes en freezer a – 20 °C.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

11.1. Homogeneizar la muestra con el molino de cuchillas (IN 689).
11.2. Realizar una toma de aproximadamente 5.0 g en un tubo tipo Falcon de 50 mL (7.10), utilizando la balanza (7.3). Registrar el peso en el RIN 57.
11.3. Agregar 10 mL de acetonitrilo y agitar manualmente durante 1 minuto, dejar reposar 5 minutos.
11.4. Agregar 1.5 g de cloruro de sodio y 4.0 g de sulfato de magnesio. Agitar manualmente durante 4 minutos.
11.5. Posteriormente centrífugar las muestras a 3200 rpm durante 10 minutos
11.6. Extraer 7 mL de la capa orgánica a un tubo Falcon de 15 mL (7.10), empleando para ello una pipeta automática de 10 mL (7.8). Evitar el pasaje de fase acuosa y sólidos.
11.7. Agregar 220 mg de C18, 410 mg de PSA y 1.0 g de sulfato de magnesio. Agitar en vortex (7.12) durante 45 segundos.
11.8. Centrifugar el extracto a 3800 rpm durante 10 minutos.
11.9. Filtrar 1.0 mL del sobrenadante usando una jeringa de 2.0 mL (7.15) y filtro de PVDF de 0.2 µm (7.16).
11.10. Inyectar en el cromatógrafo líquido acoplado a detector de masas tándem (7.1).

Análisis cromatográfico

11.11. Prender el cromatógrafo líquido Shimadzu 8050, según INE 67. Seleccionar el método Plaguicidas 2022.

*Fase móvil:	Flujo: 0,4 mL /min Sistema desgasificador.		
(Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Canal A: Agua (5mM Formiato de amonio) Canal B: Metanol (5mM Formiato de amonio)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	98	2
Tiempo de corrida: 17 minutos	0.5	50	50
	2.5	45	55
	5.5	25	75
	7.5	15	85
	8.3	0	100
	13	0	100
	13.3	98	2
	17	98	2

* Inyección:	Volumen de inyección del método: 1.2 µL (según el modo de inyección programado, determina un volumen final de 4.8 µL de muestra).
* Columna:	Shim pack Velox C18 1.8 µm, 2.1 x 100 mm. Temperatura: 40 °C.
*Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C. Heat Block Temperature: 400 °C.

*Parámetros del detector MS/MS para cada plaguicida a ser determinado. Ver tabla 2

Tabla 2. Parámetros del detector MS/MS para cada compuesto

Name	Polarity	m/z(1)	m/z(2)	Ref.(1) m/z(1)	Ref.(1) m/z(2)	Target Dwell Time	Target Q1 Pre Bias	Target CE	Target Q3 Pre Bias	Ref Dwell Time	Ref Q1 Pre Bias	Ref CE	Ref Q3 Pre Bias
2,4-D (2,4-PA)	-	219,2	161	219,2	125	50.0	15.0	14.0	15.0	20.0	15.0	27.0	24.0
Acephate	+	184,0	143	184,0	49	40.0	-20.0	-10.0	-27.0	15.0	-20.0	-22.0	-19.0
Acetamiprid	+	223,1	126	223,1	56	40.0	-26.0	-11.0	-24.0	15.0	-26.0	-16.0	-22.0
Alachlor	+	270,1	238	270,1	162	50.0	-14.0	-11.0	-16.0	20.0	-14.0	-21.0	-30.0
Ametryn	+	228,1	186	228,1	68	40.0	-12.0	-9.0	-19.0	15.0	-12.0	-40.0	-27.0
Atrazine	+	216,1	174	216,1	104	40.0	-24.0	-13.0	-18.0	15.0	-24.0	-30.0	-20.0
Atrazine-desethyl	+	188,1	146	188,1	104	40.0	-22.0	-18.0	-30.0	15.0	-22.0	-24.0	-19.0
Atrazine-desisopropyl	+	174,1	68	174,1	104	40.0	-20.0	-29.0	-26.0	15.0	-20.0	-23.0	-20.0
Azinphos-methyl	+	318,0	132	318,0	77	40.0	-16.0	-16.0	-28.0	15.0	-16.0	-36.0	-29.0
Azoxystrobin	+	404,0	372	404,0	329	40.0	-18.0	-5.0	-27.0	15.0	-18.0	-26.0	-23.0
Bifenthrin	+	440,2	181	440,2	165	50.0	-13.0	-17.0	-19.0	20.0	-13.0	-55.0	-30.0
Bispiribac Na	+	453,1	297	453,1	179	40.0	-17.0	-19.0	-19.0	15.0	-17.0	-23.0	-17.0
Carbaryl (NAC)	+	202,1	145	202,1	117	40.0	-22.0	-12.0	-28.0	15.0	-22.0	-25.0	-22.0
Carbendazim	+	192,1	160	192,1	132	40.0	-22.0	-19.0	-30.0	15.0	-22.0	-30.0	-25.0
Carbofuran	+	222,1	165	222,1	77	40.0	-25.0	-6.0	-17.0	15.0	-25.0	-44.0	-30.0
Chlorantraniliprole	+	483,9	453	483,9	286	40.0	-14.0	-19.0	-22.0	15.0	-14.0	-17.0	-30.0
Chlorpyrifos	+	350,0	198	350,0	971	40.0	-17.4	-23.4	-18.6	15.0	-26.2	-28.8	-37.5
Chlorpyrifos-methyl	+	324,0	125	324,0	292	40.0	-17.0	-21.0	-22.0	15.0	-17.0	-16.0	-30.0
Clomazone	+	239,9	125	239,9	89	40.0	-12.0	-11.0	-23.0	15.0	-12.0	-48.0	-16.0
Cyhalofop-butyl	+	375,2	120	375,2	256	40.0	-18.0	-32.0	-21.0	15.0	-18.0	-16.0	-18.0
Cyhalothrin (isomer)	+	467,1	225	467,1	450	50.0	-13.0	-18.0	-24.0	20.0	-13.0	-11.0	-16.0
Cymoxanil	+	199,1	111	199,1	128	40.0	-23.0	-19.0	-18.0	15.0	-23.0	-9.0	-23.0
Cypermethrin (isomer)	+	432,9	191	432,9	416	50.0	-22.0	-15.0	-19.0	20.0	-22.0	-9.0	-30.0
Cyproconazole	+	292,1	70	292,1	125	40.0	-15.0	-22.0	-28.0	15.0	-15.0	-32.0	-23.0
Deltamethrin	+	523,0	281	523,0	506	40.0	-26.0	-17.0	-29.0	15.0	-26.0	-11.0	-36.0
Diazinon	+	305,1	169	305,1	153	40.0	-16.0	-12.0	-17.0	15.0	-16.0	-16.0	-29.0
Diclosulam	+	406,1	161	406,1	378	40.0	-12.0	-27.0	-28.0	15.0	-12.0	-15.0	-26.0
Difenoconazole (isomer)	+	406,1	251	406,1	110	40.0	-12.0	-25.0	-17.0	15.0	-12.0	-55.0	-21.0
Diflubenzuron	+	311,0	158	311,0	141	40.0	-16.0	-16.0	-29.0	15.0	-16.0	-32.0	-27.0
Diuron (DCMU)	+	233,0	72	233,0	462	40.0	-26.0	-8.0	-27.0	15.0	-26.0	-17.0	-18.0

Endosulfan-sulfate	-	418,8	971	418,8	97	40.0	30.0	22.0	20.0	15.0	16.0	35.0	19.0
Epoxiconazole	+	330,3	121	330,3	101	40.0	-17.0	-11.0	-22.0	15.0	-17.0	-44.0	-19.0
Ethion	+	385,0	143	385,0	199	40.0	-20.0	-25.0	-28.0	15.0	-20.0	-10.0	-20.0
Fenazaquin	+	307,2	57	307,2	161	40.0	-16.0	-13.0	-23.0	15.0	-16.0	-12.0	-16.0
Fipronil	-	435,0	330	435,0	250	40.0	16.0	16.0	24.0	15.0	16.0	27.0	27.0
Flumetsulam	+	326,1	129	326,1	109	40.0	-17.0	-27.0	-25.0	15.0	-17.0	-40.0	-18.0
Flumioxazin	+	355,0	327	355,0	299	40.0	-16.0	-10.0	-22.0	15.0	-16.0	-43.0	-25.0
Fluroxypyr-1-methylhep-tylester	+	367,1	255	367,1	209	40.0	-11.0	-12.0	-26.0	15.0	-11.0	-24.0	-21.0
Flutriafol (isomer)	+	302,1	70	302,1	123	40.0	-15.0	-22.0	-28.0	15.0	-15.0	-26.0	-22.0
Fomesafen	+	456,0	344	456,0	223	40.0	-14.0	-15.0	-24.0	15.0	-14.0	-30.0	-15.0
Haloxyfop-methyl	+	376,1	316	376,1	91	40.0	-11.0	-8.0	-22.0	15.0	-11.0	-27.0	-16.0
Hexaconazole	+	314,1	70	314,1	159	40.0	-16.0	-22.0	-27.0	15.0	-16.0	-30.0	-30.0
Imazalil	+	297,1	159	297,1	41	40.0	-15.0	-23.0	-16.0	15.0	-15.0	-31.0	-16.0
Imazapyr	+	262,3	217	262,3	69	40.0	-20.0	-20.3	-20.0	15.0	-20.0	-28.1	-24.0
Imazethapyr	+	290,3	245	290,3	177	40.0	-22.0	-21.1	-23.0	15.0	-22.0	-27.3	-33.0
Imidacloprid	+	256,1	209	256,1	175	40.0	-13.0	-16.0	-21.0	15.0	-13.0	-21.0	-17.0
Iprodione	+	330,0	121	330,0	101	40.0	-9.8	-21.9	-9.8	15.0	-24.9	-36.0	-37.5
Isoxadifen-ethyl	+	296,1	232	296,1	263	40.0	-15.0	-12.0	-24.0	15.0	-15.0	-12.0	-28.0
Kresoxim-methyl	+	314,1	267	314,1	116	40.0	-16.0	-8.0	-18.0	15.0	-16.0	-22.0	-22.0
Linuron	+	248,8	160	248,8	182	40.0	-12.0	-18.0	-30.0	15.0	-12.0	-16.0	-18.0
Malaoxon	+	315,1	99	315,1	128	40.0	-16.0	-14.0	-18.0	15.0	-16.0	-7.0	-23.0
Malathion	+	331,0	127	331,0	285	40.0	-26.2	-13.3	-11.1	15.0	-24.9	-8.3	-17.4
Metalaxyl	+	280,1	220	280,1	192	40.0	-14.0	-6.0	-22.0	15.0	-14.0	-13.0	-20.0
Methidathion	+	320,0	145	320,0	85	40.0	-16.0	-12.0	-27.0	15.0	-16.0	-27.0	-15.0
Methiocarb	+	261,0	121	261,0	169	40.0	-26.0	-19.0	-23.0	15.0	-26.0	-10.0	-17.0
Methoxyfenozide	+	369,2	149	369,2	313	40.0	-19.0	-8.0	-30.0	15.0	-19.0	-9.0	-21.0
Metolachlor	+	284,1	252	284,1	134	40.0	-14.0	-6.0	-17.0	15.0	-14.0	-32.0	-24.0
Metribuzin	+	215,1	187	215,1	49	40.0	-23.0	-18.0	-19.0	15.0	-23.0	-26.0	-19.0
Metsulfuron Methyl	+	382,1	167	382,1	199	40.0	-14.8	-17.4	-14.8	15.0	-28.7	-22.2	-18.6
Permethrin	+	408,1	183	408,1	355	50.0	-12.0	-21.0	-19.0	20.0	-12.0	-10.0	-26.0
Picoxystrobin	+	368,0	145	368,0	205	40.0	-19.0	-12.0	-28.0	15.0	-19.0	-5.0	-21.0

Pirimiphos-methyl	+	306,1	164	306,1	67	40.0	-17.0	-18.0	-17.0	15.0	-17.0	-40.0	-27.0
Prochloraz	+	376,0	308	376,0	70	40.0	-11.0	-8.0	-21.0	15.0	-11.0	-26.0	-29.0
Profenofos	+	375,0	305	375,0	347	40.0	-11.0	-19.0	-21.0	15.0	-11.0	-13.0	-24.0
Propamocarb	+	189,2	102	189,2	144	40.0	-18.0	-8.0	-19.0	15.0	-18.0	-14.0	-15.0
Propanil	+	218,0	162	218,0	127	40.0	-24.0	-14.0	-17.0	15.0	-24.0	-24.0	-25.0
Propaquizafop	+	444,1	70	444,1	100	40.0	-21.0	-22.0	-20.0	15.0	-21.0	-42.0	-28.0
Propiconazole (stereo isomer)	+	342,0	159	342,0	69	40.0	-17.0	-28.0	-16.0	15.0	-17.0	-22.0	-27.0
Pyraclostrobin	+	388,0	194	388,0	164	40.0	-21.0	-8.0	-21.0	15.0	-21.0	-19.0	-30.0
Pyrazosulfuron-ethyl	+	415,1	182	415,1	139	40.0	-12.0	-10.0	-19.0	15.0	-12.0	-42.0	-27.0
Pyrimethanil	+	200,1	107	200,1	77	40.0	-21.0	-24.0	-19.0	15.0	-21.0	-44.0	-30.0
Simazine	+	202,1	104	202,1	68	40.0	-23.0	-25.0	-19.0	15.0	-23.0	-32.0	-27.0
Tebuconazole	+	308,2	70	308,2	125	40.0	-16.0	-22.0	-28.0	15.0	-16.0	-38.0	-23.0
Terbacil	-	215,1	159	215,1	42	40.0	15.0	16.0	30.0	15.0	15.0	27.0	15.0
Thiabendazole	+	202,0	175	202,0	131	40.0	-22.0	-15.0	-18.0	15.0	-22.0	-27.0	-24.0
Thiamethoxam	+	292,0	181	292,0	211	40.0	-15.0	-22.0	-18.0	15.0	-15.0	-13.0	-22.0
Tricyclazole	+	190,1	136	190,1	109	40.0	-22.0	-24.0	-24.0	15.0	-22.0	-36.0	-21.0
Trifloxystrobin	+	409,1	186	409,1	145	40.0	-20.0	-6.0	-19.0	15.0	-20.0	-29.0	-29.0
Triflumuron	+	359,1	156	359,1	139	40.0	-14.0	-17.0	-26.0	15.0	-14.0	-34.0	-23.0
Triticonazole	+	318,1	70	318,1	125	40.0	-16.0	-22.0	-28.0	15.0	-16.0	-28.0	-23.0

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada plaguicida, el área del pico correspondiente a la transición de cuantificación, en función de la concentración de fortificación del estándar preparado. Para el rango lineal definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde "y" es el área del plaguicida y "x" la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se evalúa la linealidad de la curva de calibración de cada plaguicida, a partir del cálculo de residuales. Se considera un ajuste adecuado, si se obtienen valores de residuales menores al 20 %.

12.3. Se comparan las señales de la muestra y de los estándares, para identificar los compuestos analizados. Los tiempos de retención para los analitos en las muestras extraídas, deben coincidir con los tiempos en los estándares de calibración, dentro de una tolerancia de ± 0.1 minutos. Se deberá seleccionar como mínimo dos iones productos a partir de un ion precursor y establecer la relación entre las intensidades de estos iones, expresada como razón relativa al ion más intenso. Para las muestras extraídas, esta relación entre iones debe ser ± 30% de la calculada, como promedio de las relaciones de las intensidades de los iones productos, en los estándares de calibración utilizados.

12.4. La concentración de cada plaguicida en el extracto se calcula interpolando su área, en la curva de calibración correspondiente

$$C_{\text{plaguicida i, extracto}}\ (\mu g/L) = \frac{(\text{Área}_{\text{plaguicida extracto i}}) - b}{a}$$

Donde:

C plaguicida i, extracto (µg/L): concentración del plaguicida en µg/L.

a y b: corresponde a los coeficientes de la curva.

Área de plaguicida extracto i: área de la señal de la muestra correspondiente al extracto.

12.5. La concentración final de cada plaguicida en la muestra se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$C_{\text{plaguicida i, muestra}}\ (\mu g/kg) = (C_{\text{plaguicida i, extracto}}) \times (V_{sol}/M_m)$$

Donde:

C plaguicida i, muestra: concentración de plaguicida i en la muestra.

Vsol : Volumen de solvente utilizado en mL

Mm : Masa de muestra

12.6. Es posible realizar una cuantificación utilizando un solo nivel de calibración siempre y cuando el área del analito en la muestra y en el estándar sean similares (dentro de ± 30 %).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza un blanco de matriz, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que los cromatogramas no contengan señales que interfieran con los compuestos de interés. Además, se verificará que el solvente utilizado para la reconstitución final de las muestras no presente contaminantes que interfieran en la determinación. Estos controles no se incluyen dentro de los gráficos de control.

13.2. **Control de recuperación de fortificaciones:** Se evalúa la recuperación de todos los analitos de interés, realizando el análisis de un fortificado cada 5 muestras y como mínimo 1 por batch. Para ello, fortificar una muestra con la solución 8.15, de tal forma que para al menos una muestra fortificada, la concentración final corresponda a aproximadamente el límite de cuantificación del método. La recuperación de la adición debe estar dentro del rango 60 -140 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos. En caso de no cumplimiento, evaluar la posibilidad de informar utilizando límite de reporte.

La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{(C_{\text{plaguicida i, Mf}} \times M_{mf}) - (C_{\text{plaguicida i, M}} \times M_{mf})}{(V_{\text{Std Fort}} \times C_{\text{Std fort, plaguicida i}})}$$

donde:

C plaguicida i, Mf : concentración de cada plaguicida en la muestra adicionada, en µg/kg.

Mmf : masa de la muestra fortificada en g.

C plaguicida i, M: concentración de cada plaguicida en la muestra sin adicionar, en µg/kg.

Mmf: masa de la muestra fortificada en g.

V Std Fort: volumen del estándar de fortificación 8.15 adicionado a la muestra, en mL.

C Std fort: concentración del estándar de fortificación 8.15 en µg/L.

13.3. **Control de veracidad de la determinación:** En caso de ser posible, evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), utilizando un material de referencia certificado. Dicho control se prepara en forma análoga a los puntos de curva en matriz y a una concentración incluida dentro del rango de calibración. Se incluye como mínimo un control de veracidad por batch de análisis. De ser posible, el material de referencia deberá incluir la totalidad de los plaguicidas a analizar.

La concentración obtenida para cada plaguicida debe estar en el rango 60-140 % o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento analítico y evaluar la repetición del análisis.

13.4. **Control continuo de calibración del equipo:** El control de calibración es utilizado para poder identificar posibles cambios de sensibilidad durante la determinación analítica. Para ello se incluye un punto de curva en matriz de concentración intermedia cada 10 inyecciones y al final de la secuencia como mínimo 3 puntos de curva. Se acepta hasta un 30 % de variación de la sensibilidad. Si se obtiene una diferencia de señal mayor al 30 % con respecto a la primera inyección de estándar, evaluar la repetición parcial o total del análisis cromatográfico. Estos controles no se incluyen dentro de los gráficos de control.

13.5. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 5 muestras y como mínimo 1 por batch de muestras. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 20 %, para cada plaguicida.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC international. 86 (2003) 412–431.

14.2. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (Documento SANTE/11312/2021).

8092UY

Determinación de plaguicidas en aguas naturales

Extracción en Fase Sólida (SPE) y determinación por Cromatografía Líquida acoplada a detector de masas tándem (MS/MS)

Elaborado - R. Souza, V. Muñoz

Modificado - R. Souza

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de 80 plaguicidas en aguas naturales, efluentes industriales y otras matrices líquidas asimilables a las anteriores, establecidos en la Tabla 1. También se incluyen los rangos de trabajo y el límite de cuantificación (LOQ).

Tabla 1: Lista de plaguicidas incluidos en este procedimiento, incluyendo rango de trabajo y LOQ.

Name	Nombre	Nº CAS	Límite de cuantificación (µg/L)	Rango de trabajo (µg/L)
Acetamiprid	Acetamiprid	135410-20-7	0,0025	0,0025-0,050
Alachlor	Alacloro	15972-60-8	0,0025	0,0025-0,050
Ametryn	Ametrina	834-12-8	0,0025	0,0025-0,050
Atrazine	Atrazina	1912-24-9	0,0025	0,0025-0,050
Atrazine-desethyl	Atrazina desetil	6190-65-4	0,0025	0,0025-0,050
Atrazine-desisopropyl	Atrazina desisopropil	1007-28-9	0,0050	0,005-0,050
Azinphos-methyl	Azinfos metil	86-50-0	0,0025	0,0025-0,050
Azoxystrobin	Azoxiestrobina	131860-33-8	0,0025	0,0025-0,050
Bifenthrin	Bifentrina	82657-04-3	0,0025	0,0025-0,050
Carbaryl (NAC)	Carbaril	63-25-2	0,0025	0,0025-0,050
Carbendazim	Carbendazim	10605-21-7	0,0050	0,0050-0,050
Carbofuran	Carbofurano	1563-66-2	0,0025	0,0025-0,050
Chlorantraniliprole	Clorantraniprol	500008-45-7	0,0025	0,0025-0,050
Chlorpyrifos	Clorpirifos	2921-88-2	0,0050	0,0050-0,050
Chlorpyrifos-methyl	Clorpirifós Metil	5598-13-0	0,0025	0,0025-0,050
Clomazone	Clomazone	81777-89-1	0,0025	0,0025-0,025
Cyhalofop-butyl	Cihalofop-butil	122008-85-9	0,0050	0,0050-0,050
Cymoxanil	Cimoxanilo	57966-95-7	0,0050	0,0050-0,050
Cypermethrin	Cipermetrina	52315-07-8	0,0050	0,0050-0,050
Cyproconazole	Ciproconazol	94361-06-5	0,0025	0,0025-0,050
Deltamethrin	Deltametrina	52918-63-5	0,0025	0,0025-0,025
Diazinon	Diazinon	333-41-5	0,0025	0,0025-0,050
Diclosulam	Diclosulam	145701-21-9	0,0050	0,0050-0,050
Difenoconazole	Difenoconazol	119446-68-3	0,0025	0,0025-0,050
Diflubenzuron	Diflubenzuron	35367-38-5	0,0025	0,0025-0,050
Diuron (DCMU)	Diuron	330-54-1	0,0025	0,0025-0,050
Endosulfan-sulfate	Endosulfan sulfato	1031-07-8	0,0025	0,0025-0,050
Epoxiconazole	Epoxiconazol	135319-73-2	0,0025	0,0025-0,050
Ethion	Etión	563-12-2	0,0025	0,0025-0,025
Fenazaquin	Fenazaquin	120928-09-8	0,0025	0,0025-0,025
Fipronil	Fipronil	120068-37-3	0,0025	0,0025-0,050
Fluroxypyr-1-methylhepty-lester	Fluroxipir 1-metilheptil ester	81406-37-3	0,0025	0,0025-0,050
Flumioxazin	Flumioxazin	103361-09-7	0,010	0,010-0,050
Flutriafol	Flutriafol	79983-71-4	0,0025	0,0025-0,050
Haloxyfop-methyl	Haloxifop metil	69806-40-2	0,0050	0,0050-0,050
Hexaconazole	Hexaconazol	79983-71-4	0,0025	0,0025-0,050
Imazalil	Imazalil	35554-44-0	0,0025	0,0025-0,050
Imidacloprid	Imidacloprid	138261-41-3	0,0025	0,0025-0,050
Iprodione	Iprodione	36734-19-7	0,0025	0,0025-0,050
Isoxadifen-ethyl	Isoxadifen etil	163520-33-0	0,0025	0,0025-0,050
Kresoxim-methyl	Kresoxim metil	143390-89-0	0,0025	0,0025-0,050

Linuron	Linuron	330-55-2	0,0025	0,0025-0,050
Malaoxon	Malaoxon	1634-78-2	0,0025	0,0025-0,050
Malathion	Malatión	121-75-5	0,0025	0,0025-0,050
Metalaxyl	Metalaxil	57837-19-1	0,0025	0,0025-0,050
Methidathion	Metidation	950-37-8	0,0025	0,0025-0,050
Methiocarb	Metiocarb	2032-65-7	0,0025	0,0025-0,050
Methoxyfenozide	Metoxifenocida	161050-58-4	0,0025	0,0025-0,050
Metolachlor	Metolacloro	51218-45-2	0,0025	0,0025-0,050
Metribuzin	Metribuzina	21087-64-9	0,0025	0,0025-0,050
Permethrin	Permetrina	52645-53-1	0,0050	0,0050-0,050
Picoxystrobin	Picoxistrobin	117428-22-5	0,0025	0,0025-0,050
Pirimiphos-methyl	Pirimifos metil	29232-93-7	0,0025	0,0025-0,050
Prochloraz	Procloraz	67747-09-5	0,0025	0,0025-0,050
Profenofos	Profenofos	41198-08-7	0,0025	0,0025-0,050
Propanil	Propanil	709-98-8	0,0025	0,0025-0,050
Propaquizafop	Propaquizafop	111479-05-1	0,0025	0,0025-0,050
Propiconazole	Propiconazol	60207-90-1	0,0025	0,0025-0,050
Pyraclostrobin	Piraclostrobina	175013-18-0	0,0025	0,0025-0,025
Pyrazosulfuron-ethyl	Pirazosulfuron etil	93697-74-6	0,0025	0,0025-0,050
Pyrimethanil	Pirimetanil	53112-28-0	0,0025	0,0025-0,050
Simazine	Simazina	122-34-9	0,0025	0,0025-0,050
Tebuconazole	Tebuconazol	107534-96-3	0,0025	0,0025-0,050
Terbacil	Terbacil	5902-51-2	0,0025	0,0025-0,050
Thiabendazole	Tiabendazol	148-79-8	0,0025	0,0025-0,050
Thiamethoxam	Tiametoxam	153719-23-4	0,0025	0,0025-0,050
Tricyclazole	Triciclazol	41814-78-2	0,0025	0,0025-0,050
Trifloxystrobin	Trifloxiestrobina	141517-21-7	0,0025	0,0025-0,050
Triflumuron	Triflumuron	64628-44-0	0,0025	0,0025-0,050
Triticonazole	Triticonazol	131983-72-7	0,0025	0,0025-0,050

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del Cromatógrafo Liquido con detector de masas tándem triple cuadrupolo Shimadzu 8050 UHPLC-MS/MS (INE 139).
2.6. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121)
2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 07, INE93, INE 153)
2.8. Ruta de análisis de plaguicidas en aguas naturales por SPE/LC (RIN 56)
2.9. Ruta de preparación de soluciones madres estándares (RIN 35).
2.10. Ruta de de preparación de Mixes (RIN 45).
2.11. Registro de masa de SOLUCIONES MADRE Y MIXES (RIN 51).
2.12. Instructivo de uso de concentrador de muestras Labconco modelo RapidVap (INE 127).
2.13. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108)
2.14. Instructivo de uso de mufla (INE 27).
2.15. Instructivo de uso de estufa (INE 107, INE 101)
2.16. Instructivo de uso de la bomba de vacío Gast (INE 02).
2.17. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).
2.18. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINAMA (ES 01)
2.19. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los compuestos de la Tabla 1 son extraídos de la matriz agua utilizando columnas de extracción en fase sólida SPE (C18), previamente acondicionadas. Los plaguicidas retenidos son eluidos con acetato de etilo. El extracto es concentrado en un bloque calefactor a 30 °C bajo corriente de N_2. Finalmente, el concentrado obtenido es reconstituido con acetonitrilo.
3.2. Los analítos se determinan por cromatografía liquida acoplada a detector de masas tándem.
3.3. La cuantificación de cada plaguicida se realiza por interpolación del área de la señal de la transición de mayor intensidad para el analito en la muestra, en la curva de calibración correspondiente o por comparación con un punto de esta, siempre que la diferencia de áreas no sea mayor al 20 %.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes para la manipulación de la muestra.
4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
4.3. Todos los solventes se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

5.1. En caso de presentarse una interferencia por parte de la matriz, que coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (de cuantificación o confirmación) se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación.
5.2. Las interferencias producto de la matriz que repercuten en la recuperación de algunos analitos, se ve compensadas por el uso de curva de calibración en matriz.
5.3. Restos de jabón (dodecil sulfato de sodio): genera un pH básico en la superficie del material de vidrio, el cual puede degradar parcialmente algunos analitos (especialmente compuestos organofosforados). Por lo cual, todo el material utilizado, deberá ser acondicionado adecuadamente.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en botella de 1 L de vidrio ámbar, previamente enjuagada con hexano y acetona, con contratapa de teflón enjuagada con acetona (o papel aluminio).
6.2. Preservar las muestras a ≤6 °C (> 0 °C). El tiempo máximo de almacenamiento son 7 días para la extracción y 40 días para la determinación.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Equipo UHPLC-MS/MS SHIMADZU 8050. En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares, que permita las prestaciones definidas en este documento. (IN647 – IN648).
7.2. Columna cromatografica: Shim pack Velox C18 1.8 µm, 2.1 x 100 mm o similar.
7.3. Generador de Nitrógeno, Peak Genius 10 Series-1051 o similar, Presión de salida 100psi, flujo mayor a 25L/min. (IN651)
7.4. Balanza de resolución 0,00001 g y 0,001 g.
7.5. Viales de vidrio de 2, 4 y 12 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.
7.6. Jeringa de vidrio o descartable de plástico, de 1 a 5 mL.
7.7. Matraces aforados de 5,00 y 10,00 mL
7.8. Microjeringas de vidrio de 10, 50, 250 y 1000 µL.
7.9. Estufa de secado.

7.10. Mufla.
7.11. Equipo de extracción para columnas de SPE, Sep-Pak, marca Waters, cañerías y canillas de teflón. (IN364).
7.12. Vórtex.
7.13. Pipetas automáticas regulable de 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.
7.14. Tips para pipetas automáticas 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.
7.15. Filtro de cartucho de PVDF o PFTE con tamaño de poro 0,22 µm.
7.16. Botellas vidrio ámbar 500 mL.
7.17. Bomba de vacío marca Gast-Motor o similar.
7.18. Baño de agua con ultrasonido.
7.19. Concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2.
7.20. Tubos de vidrio con fondo cónico para concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2.
7.21. Desionizador de agua Millipore Elix Escentials o similar.

8. REACTIVOS

8.1. Hexano libre de plaguicida $CH_3(CH_2)_4CH_3$ Nro. CAS 110-54-3 (marca Baker, Mallinckrodt o similar)
8.2. Acetona libre de plaguicida $(CH_3)_2CO$ Nro. CAS 67-64-1 (Baker, Mallinckrodt o similar)
8.3. Acetato de etilo grado plaguicida CH_3COOC_2H5 Nro. CAS 141-78-6 (Baker, Mallinckrodt o similar)
8.4. Metanol para cromatografía (Baker, Mallinckrodt o similar)
8.5. Acetonitrilo calidad HPLC, CH_3CN Nro. CAS 75-05-8 (Baker, Mallinckrodt o similar)
8.6. Agua desionizada (grado 1, según ISO 3696 en su versión vigente)
8.7. Cloruro de sodio NaCl Nro. CAS 7647-14-5
8.8. Formiato de amonio HCO_2NH_4 Nro. CAS 540-69-2
8.9. Columnas de fase sólida (SPE) C18 (Supelco o similar)
8.10. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la Tabla 1 del presente documento.
8.11. Solución stock madre individual de cada plaguicida (concentración aproximada 1000 mg/L): se prepara según lo establecido en el punto 5.1 del PGC 22, a partir de los MRC 8.10.
8.12. Solución stock mix de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 10 mg/L): se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.11.
8.13. Solución de fortificación de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 10 µg/L), preparada a partir de 8.12.
8.14. Nitrógeno (pureza 99,9 %)
8.15. Argón alta pureza (99,998 o 4.8)
8.16. Detergente no alcalino para limpieza (Extran)
8.17. Sulfato de sodio anhidro Nro. CAS 7757-82-6

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.
9.2. Todo el material de vidrio que será utilizado, tanto para la toma de muestra, como para la etapa de extracción y purificación debe ser lavado con agua y Extran y enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona libres de plaguicidas y de ser necesario muflar. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.
9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.
9.4. Verificar que en la etapa de pasaje de la muestra por la columna SPE, la totalidad del sólido remanente sea trasvasado, enjuagando sucesivas veces con agua desionizada, las paredes y fondo del frasco contenedor de muestra.
9.5. El proceso de secado de las columnas SPE luego de la extracción es muy importante; esto se logra, dejando bajo vacío durante 1 hora, luego de verificar que está pasando aire por la columna.
9.6. En la etapa de concentración por evaporación con arrastre de N_2, es importante interrumpir el proceso de concentración, en el momento en que la muestra llegue a sequedad.
9.7. Control de peso de soluciones estándar: Para las soluciones mencionadas en los puntos 8.5 y 8.6, realizar control de peso antes de usar. Se admite una diferencia de peso máxima de 1% respecto al último valor registrado. En caso de superar este valor, se evaluará la posibilidad de reconstituir al volumen inicial o preparar nuevamente. Luego de utilizar la solución, se registra su nuevo peso en el RIN 51. Este valor es utilizado para la verificación de la solución antes del próximo uso.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Tratar los puntos de la curva como muestras. Los mismos se realizan mediante la fortificación de 5 alícuotas de una matriz blanco, previo a iniciar el tratamiento de estas, con solución 8.12 o diluciones de esta. Se deberá realizar en cada batch de medida un blanco de esta matriz para verificar la ausencia de contaminantes en la misma. La vigencia de la curva realizada mediante este procedimiento es de 1 mes en freezer a – 20 °C.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Acondicionamiento de las columnas SPE

11.1. En un soporte apropiado colocar las columnas SPE a acondicionar, junto con sus correspondientes canillas de teflón.
11.2. Agregar los siguientes solventes en orden sucesivo teniendo la precaución de no dejar secar la fase sólida entre agregados: hexano 6 mL, acetona 6 mL, metanol 12 mL y agua desionizada 12 mL. Luego de finalizado el acondicionamiento, es necesario dejar un remanente de aproximadamente 5 mL de agua desionizada en la columna. La columna queda pronta para proceder con la extracción.

Toma de muestra y extracción

11.3. Homogeneizar la muestra.
11.4. Realizar una toma de aproximadamente 200 mL registrando el peso en el RIN 56; esta toma debe realizarse en un recipiente de vidrio 500mL utilizando una balanza de resolución 0,001 g.
11.5. Añadir 5 g de cloruro de sodio.
11.6. Colocar las columnas SPE previamente acondicionadas en el equipo de extracción, manteniendo las canillas de teflón cerradas.
11.7. Conectar la bomba de vacío al equipo de extracción, intercalando en la cañería una trampa de seguridad para evitar el ingreso de muestra a la bomba.
11.8. Conectar las cañerías de teflón a las columnas SPE teniendo la precaución de que estas contengan agua suficiente de manera que al comenzar el proceso de succión no se seque la fase sólida. El extremo libre se coloca en el frasco que contiene la muestra; esta cañería debe quedar tocando el fondo del recipiente.
11.9. Encender la bomba de vacío y posteriormente abrir las canillas de las columnas, de manera de lograr un goteo continuo de aproximadamente 3 mL por minuto. Verificar la hermeticidad de las columnas, marcando el nivel de muestra en la columna y controlando que este no varía con el tiempo.
11.10. Agitar el contenido de cada frasco en forma periódica, a fin de suspender los sólidos contenidos en la muestra y evitar que se depositen en el fondo del frasco, bloqueando la entrada de la cañería de teflón.
11.11. Finalizado el pasaje de toda la muestra, es necesario enjuagar tres veces el recipiente contenedor, asegurándose que todo el sedimento contenido en la muestra ingrese a la columna SPE.
11.12. En este punto se inicia el proceso de secado de las columnas. Con la misma configuración del equipo se deja aproximadamente 1 hora en vacío, verificando el pasaje de aire a través de las columnas.
11.13. Los puntos 11.11 y 11.12 son pasos fundamentales para lograr una buena reproducibilidad de la medida y exactitud en la determinación.
11.14. Una vez secas, se adicionan 5 mL de acetato de etilo a cada columna de SPE y se procede a colocarlas en el baño de ultrasonido, dentro de un vaso de Bohemia vacío, durante 15 minutos.
11.15. A continuación, colocar las columnas SPE en un soporte apropiado para su elusión.

Realizar sucesivos agregados de acetato de etilo a la columna hasta recoger aproximadamente 22 mL de

eluato en tubos de vidrio con fondo cónico para concentrador de muestras. En caso de que se dificulte la elusión por gravedad, se podrá facilitar la misma ejerciendo presión sobre la columna.

11.16. Secar el extracto obtenido, utilizando para ello una columna de vidrio preparada con aproximadamente 2g de sulfato de sodio anhidro.

11.17. Concentrar el extracto en un bloque calefactor a 30 °C bajo corriente de N_2 hasta sequedad.

11.18. Agregar 500 µL de acetonitrilo con pipeta automática al tubo cónico de cada muestra y colocar en baño de ultrasonido durante un minuto.

11.19. Filtrar por filtro 7.15.

11.20. Recoger el filtrado en un vial de vidrio ámbar de 2 mL. La muestra queda pronta para su análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico

11.21. Prender el cromatógrafo SHIMADZU 8050 UHPLC-MS/MS. Seleccionar el método Plaguicidas2024 y verificar que las condiciones de este sean las descriptas a continuación:

*Fase móvil:	Flujo: 0,4 mL /min Sistema desgasificador.		
(Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Canal A: Agua (5mM Formiato de amonio) Canal B: Metanol (5mM Formiato de amonio)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	98	2
Tiempo de corrida: 17 minutos	0.5	50	50
	2.5	45	55
	5.5	25	75
	7.5	15	85
	8.3	0	100
	13	0	100
	13.3	98	2
	17	98	2

* Inyección:	Volumen inyección del método: 1.5 µL (según el modo de inyección programado, determina un volumen final de 6 µL de muestra)
* Columna:	Shim pack Velox C18 1.8 µm, 2.1 x 100 mm. Temperatura: 40 °C.
*Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C.

*Parámetros del detector MS/MS para cada plaguicida a ser determinado. Ver tabla 2

Nombre	Polaridad	Ión precursor (m/z)	Ión producto 1 (m/z)	Ión producto 2 (m/z)	Ión producto 3 (m/z)	Transición 1 Q1 Pre Bias	Transición 1 CE	Tarnsición 1 Q3 Pre Bias	Tran-sición 2 Q1 Pre Bias	Transición 2 CE	Tarnsición 2 Q3 Pre Bias	Tran-sición 3 Q1 Pre Bias	Transición 3 CE	Tarn-sición 3 Q3 Pre Bias
Acefato	+	184	143	49,15		-20	-10	-27	-20	-22	-19			
Imazapir	+	262,3	217,2	69,1		-20	-20,3	-20	-20	-28,1	-24			
Imazetapir	+	290,35	245,15	177,1		-22	-21,1	-23	-22	-27,3	-33			
Propamocarb	+	189,2	102,15	144,2		-18	-8	-19	-18	-14	-15			
Metsulfuron Metil	+	382,1	167,15	199		-14,8	-17,4	-14,8	-28,7	-22,2	-18,6			
Tiametoxam	+	292	181,1	211,1		-15	-22	-18	-15	-13	-22			
Desisopropil-Atrazina	+	174,1	68,15	104		-20	-29	-26	-20	-23	-20			
Flumetsulam	+	326,1	129,1	109		-17	-27	-25	-17	-40	-18			
Imidacloprid	+	256,15	209,15	175,2		-13	-16	-21	-13	-21	-17			
Acetamiprid	+	223,1	126,1	55,95		-26	-11	-24	-26	-16	-22			
Cimoxanilo	+	199,1	111,15	128,15		-23	-19	-18	-23	-9	-23			
Desetil-Atrazina	+	188,1	146,1	104,05		-22	-18	-30	-22	-24	-19			
Carbendazim	+	192,1	160,2	132,2		-22	-19	-30	-22	-30	-25			
Pirazosulfuron Etil	+	415,1	182	139,05		-12	-10	-19	-12	-42	-27			
Diclosulam	+	406,1	161	378		-12	-27	-28	-12	-15	-26			
Triciclazol	+	190,1	136	109		-22	-24	-24	-22	-36	-21			
N-(2,4-Dimethylphenyl) formamide	+	150,1	107,1	106,1		-16	-21	-19	-16	-30	-19			
Tiabendazol	+	202	175	131,15		-22	-15	-18	-22	-27	-24			
Metribuzina	+	215,1	187,1	49,1		-23	-18	-19	-23	-26	-19			
Carbofurano	+	222,1	165	77,15		-25	-6	-17	-25	-44	-30			
Malaoxon	+	315,1	98,9	127,15		-16	-14	-18	-16	-7	-23			
Simazina	+	202,1	104	68,05		-23	-25	-19	-23	-32	-27			
Carbaril	+	202,1	145,1	117		-22	-12	-28	-22	-25	-22			
Bispiribac Na	+	453,1	297,2	179,05		-17	-19	-19	-17	-23	-17			
Fomesafen	+	456	344	223,05	300	-14	-15	-24	-14	-30	-15	-14	-26	-21
Atrazina	+	216,1	174,1	104,05		-24	-13	-18	-24	-30	-20			
Flutriafol	+	302,1	70,1	123		-15	-22	-28	-15	-26	-22			
Diuron	+	233	72,1	46,15		-26	-8	-27	-26	-17	-18			
Metalaxyl	+	280,1	220	192,05		-14	-6	-22	-14	-13	-20			

Metidation	+	320	145	84,9		-16	-12	-27	-16	-27	-15			
Azinfos Metil	+	318	132,05	76,95		-16	-16	-28	-16	-36	-29			
Clorantraniliprole	+	483,9	452,9	285,9		-14	-19	-22	-14	-17	-30			
Clomazone	+	239,9	125	89		-12	-11	-23	-12	-48	-16			
Flumioxazin	+	355,05	327	299,05		-16	-10	-22	-16	-43	-25			
Ametrina	+	228,1	186	68		-12	-9	-19	-12	-40	-27			
Linuron	+	248,8	160	182,05		-12	-18	-30	-12	-16	-18			
Propanil	+	218	161,95	127		-24	-14	-17	-24	-24	-25			
Azoxistrobina	+	404	371,95	328,95		-18	-5	-27	-18	-26	-23			
Pirimetanil	+	200,1	107	77,1		-21	-24	-19	-21	-44	-30			
Metiocarb	+	226,1	121,1	169,05		-26	-19	-23	-26	-10	-17			
Malation	+	331,05	127,05	285,1	125	-26,2	-13,3	-11,1	-24,9	-8,3	-17,4	-26,2	-27,5	-21,1
Metoxyfenozide	+	369,2	149,15	312,95		-19	-8	-30	-19	-9	-21			
Ciproconazol	+	292,1	70,05	125,05		-15	-22	-28	-15	-32	-23			
Alaclor	+	270,1	238	162,15		-14	-11	-16	-14	-21	-30			
Iprodiona	+	330,05	121,1	101,1		-9,8	-21,9	-9,8	-24,9	-36	-37,5			
Epoxiconazol	+	330	121,1	101,1		-17	-11	-22	-17	-44	-19			
Triticonazol	+	318,1	70,15	125		-16	-22	-28	-16	-28	-23			
Metolaclor	+	284,1	252,05	134,15		-14	-6	-17	-14	-32	-24			
Diflubenzuron	+	311	158,1	141,05		-16	-16	-29	-16	-32	-27			
Isoxadifen Etil	+	296,1	232	263		-15	-12	-24	-15	-12	-28			
Picoxistrobina	+	368	145,1	205		-19	-12	-28	-19	-5	-21			
Kresoxim Metil	+	314,1	267	116,15		-16	-8	-18	-16	-22	-22			
Tebuconazol	+	308,2	70,05	125,05		-16	-22	-28	-16	-38	-23			
Imazalil	+	297,1	159,05	41,1	200,85	-15	-23	-16	-15	-31	-16	-15	-19	-20
Diazinon	+	305,1	169,1	153		-16	-12	-17	-16	-16	-29			
Propiconazol	+	342	158,9	69,1		-17	-28	-16	-17	-22	-27			
Piraclostrobina	+	388	194,1	164,05		-21	-8	-21	-21	-19	-30			
Hexaconazol	+	314,1	70	159		-16	-22	-27	-16	-30	-30			
Triflumuron	+	359,1	156,05	139,05		-14	-17	-26	-14	-34	-23			
Pirimifos Metil	+	306,1	164,1	66,95		-17	-18	-17	-17	-40	-27			
Clorpirifos Metil	+	324	125,1	291,7		-17	-21	-22	-17	-16	-30			

Procloraz	+	376	307,95	70		-11	-8	-21	-11	-26	-29			
Difenoconazol	+	406,1	250,9	111		-12	-25	-17	-12	-55	-21			
Cialofopo Butil	+	375,2	120	256		-18	-32	-21	-18	-16	-18			
Trifloxistrobina	+	409,1	186,1	145,1	205,9	-20	-6	-19	-20	-29	-29	-20	-10	-21
Haloxifop Metil	+	376,1	316	91,05	271,95	-11	-8	-22	-11	-27	-16	-11	-36	-28
Profenofos	+	375	304,7	346,75		-11	-19	-21	-11	-13	-24			
Propaquizafop	+	444,1	70,2	100,2		-21	-22	-20	-21	-42	-28			
Emamectina Benzoato B1b	+	872,2	158,2	82,05		-26	-37	-16	-26	-55	-13			
Etion	+	385	143	198,9		-20	-25	-28	-20	-10	-20			
Clorpirifos	+	350,05	197,95	97,1		-17,4	-23,4	-18,6	-26,2	-28,8	-37,5			
Fluroxypyr-1-methyl-heptylester	+	367,1	254,95	209		-11	-12	-26	-11	-24	-21			
Emamectina Benzoato B1a	+	886,4	158,2	82,05		-26	-31	-30	-26	-55	-16			
Lambda Cialotrina	+	467,1	225,1	450	141,05	-13	-18	-24	-13	-11	-16	-13	-45	-29
Cipermetrina	+	432,9	191	416		-22	-15	-19	-22	-9	-30			
Deltametrina	+	523	281	505,9		-26	-17	-29	-26	-11	-36			
Fenazaquin	+	307,2	57	161,1		-16	-13	-23	-16	-12	-16			
Permetrina	+	408,1	183,1	355,05		-12	-21	-19	-12	-10	-26			
Bifentrina	+	440,2	181,15	165,1		-13	-17	-19	-13	-55	-30			
Dicamba	-	218,65	175,1	177,2		27	8	38	24	7,5	20			
2,4-D	-	219,2	161	125,1		15	14	15	15	27	24			
Terbacil	-	215,1	159,1	42,15		15	16	30	15	27	15			
Fipronil	-	435	330	250,05		16	16	24	16	27	27			
Endosulfan sulfato	-	418,8	97,05	97		30	22	20	16	35	19			

11.22. La secuencia de análisis a ser utilizada debe estar diseñada de la siguiente manera: inicialmente se incluyen los blancos de reactivo y matriz, luego la curva de calibración, muestras, duplicados y fortificados. Se incluyen un control continuo de calibración cada 10 inyecciones y al finalizar la secuencia se repite la curva de calibración inicial y como mínimo un nivel de concentración en solvente.

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada plaguicida, el área del pico correspondiente a la transición de cuantificación en función de la concentración de fortificación del estándar preparado. Para el rango lineal definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde "y" es el área del plaguicida y "x" la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se evalúa la linealidad de la curva de calibración de cada plaguicida, a partir del cálculo de residuales. Se considera un ajuste adecuado, si se obtienen valores de residuales menores al 20 %.

12.3. Se comparan las señales de la muestra y de los estándares, para identificar los compuestos analizados. Los tiempos de retención para los analitos en las muestras extraídas, deben coincidir con los tiempos en los estándares de calibración, dentro de una tolerancia de ± 0.1 minutos. Se deberán de seleccionar como mínimo dos iones productos a partir de un ion precursor y establecer la relación entre las intensidades de estos iones, expresada como razón relativa al ion más intenso. Para las muestras extraídas, esta relación entre iones debe ser ± 30% de la calculada como promedio de las relaciones de las intensidades de los iones productos, en los estándares de calibración utilizados.

12.4. La concentración de cada plaguicida en el extracto se calcula interpolando su área, en la curva de calibración correspondiente

$$C_{\text{plaguicida i, extracto}}\ (\mu g/L) = \frac{(\text{Área plaguicida i, extracto}) - b}{A}$$

12.5. Es posible realizar una cuantificación utilizando un solo nivel de calibración siempre y cuando el área del analito en la muestra y en el estándar sean similares (dentro de ± 30 %).

12.6. La concentración de cada plaguicida en la muestra, en µg/L, se calcula según (ajuste por el paso de dilución en la preparación):

$$C_{\text{plaguicida i, muestra}}\ (\mu g/L) = \frac{C_{\text{plaguicida i, extracto}} \times 0.5}{\text{Toma muestra en mL}}$$

12.7. Se asume que la densidad de las muestras es siempre 1 g/mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza un blanco de matriz, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que los cromatogramas no contengan señales que interfieran con los compuestos de interés. Además, se verificará que el solvente utilizado para la reconstitución final de las muestras no presente contaminantes que interfieran en la determinación.

13.2. **Control de recuperación de fortificaciones:** Se evalúa la recuperación de todos los analitos de interés, realizando el análisis de un fortificado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch. Para ello, fortificar una muestra con la solución 8.13 de tal forma que la concentración final corresponda a aproximadamente el límite de cuantificación. La recuperación de la adición debe estar dentro del rango 60-140 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos. En caso de no cumplimiento, evaluar la posibilidad de informar utilizando límites de reporte.

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{((C_{\text{plaguicida i, muestra fortificada}}\ \mu g/L \cdot \text{Vol final muestra fortificada mL}) - (C_{\text{plaguicida i, muestra}}\ \mu g/L \cdot \text{Vol muestra mL}))}{(C_{\text{plaguicida i}}\ \text{estándar de fortifivación}\ \mu g/L \cdot \text{Vol estándar mL})}$$

donde:

Cplaguicida i, muestra fortificada: Concentración de la plaguicida i calculada según 12.6, en la muestra fortificada.

Cplaguicida i, muestra: Concentración de la plaguicida i en la muestra sin fortificar, calculada según 12.6.

Cplaguicida i, estándar fortificación: Concentarción del estándar utilizado para la fortificación.

Vol final muestra fortificada: Volumen final de muestra fortificada.

Vol muestra: Volumen de muestra sin fortificar utilizado en la fortificación.

Vol estándar: Volumen de estándar agregado a la muestra fortificada.

13.3. **Control de veracidad de la determinación:** En caso de ser posible, evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), utilizando un material de referencia certificado. Dicho control se prepara en forma análoga a los puntos de curva en matriz y a una concentración incluida dentro del rango de calibración. Se incluye como mínimo un control de veracidad por batch de análisis. De ser posible, el material de referencia deberá incluir la totalidad de los plaguicidas a analizar. En los casos en que esto no sea posible, se evaluará la posibilidad de complementar el control de veracidad, con material de referencia de distinto origen al empleado en la curva de calibración.

La concentración obtenida para cada plaguicida debe estar en el rango 60-140 % o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento analítico y evaluar la repetición del análisis del batch.

13.4. **Control continuo de calibración del equipo:** El control de calibración es utilizado para poder identificar posibles cambios de sensibilidad durante la determinación analítica. Para ello se incluye un punto de curva de concentración intermedia cada 10 inyecciones y al final de la secuencia como mínimo 3 puntos de curva. Se acepta hasta un 30 % de variación de la sensibilidad. Si se obtiene una diferencia de señal mayor al 30 % respecto a la primera inyección del estándar (durante el análisis la curva en matriz), evaluar la repetición parcial o total del análisis cromatográfico.

13.5. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 10 muestras y como mínimo 1 por batch de muestras. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 20 %, para cada plaguicida.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA Method 8321 B, Revision 2, February 2007

14.2. EPA Method 3535A Solid-Phase Extraction (SPE), Revision 1, February 2007.

14.3. EPA Chapter 4 Organic Analytes, Revision 6, December 2018.

14.4. European commission directorate-general for health and food safety. "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed" (SANTE 11312/2021).

8093UY

Determinación de plaguicidas en sedimentos

Extracción Sólido-Líquido, clean up dispersivo y
determinación por Cromatografía Líquida (LC)
con detector de espectrometría de masas en tándem

Elaborado - R. Souza, V. Muñoz

Modificado - R. Souza

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de 80 plaguicidas en aguas naturales, efluentes industriales y otras matrices líquidas asimilables a las anteriores, establecidos en la Tabla 1. También se incluyen los rangos de trabajo y el límite de cuantificación (LOQ).

Tabla 1- Listado de plaguicidas validados para la presente metodología analítica.

	Compuesto	Nº CAS	Rango de trabajo (µg/kg)	Límite de cuantificación (µg/kg)
1	Alacloro	15972-60-8	0,5-20	0,5
2	Ametrina	834-12-8	0,5-20	0,5
3	Atrazina	1912-24-9	0,5-20	0,5
4	Atrazina desetil	6190-65-4	0,5-20	0,5
5	Atrazina desisopropil	1007-28-9	0,5-20	0,5
6	Azinfos metil	86-50-0	0,5-20	0,5
7	Azoxiestrobina	131860-33-8	0,5-20	0,5
8	Bifentrina	82657-04-3	0,5-20	0,5
9	Carbaril	63-25-2	0,5-20	0,5
10	Carbofurano	1563-66-2	0,5-20	0,5
11	Carbendazim	10605-21-7	0,5-20	0,5
12	Clorantraniliprole	500008-45-7	0,5-20	0,5
13	Clorpirifos	2921-88-2	0,5-20	0,5
14	Clorpirifos Metil	5598-13-0	0,5-20	0,5
15	Clomazone	81777-89-1	0,5-20	0,5
16	Ciproconazol	94361-06-5	0,5-20	0,5
17	Cyhalofop butil	122008-85-9	0,5-20	0,5
18	Cipermetrina	52315-07-8	0,5-20	0,5
19	Diazinon	333-41-5	0,5-20	0,5
20	Deltametrina	52918-63-5	0,5-20	0,5
21	Diuron	330-54-1	0,5-20	0,5
22	Difenoconazol	119446-68-3	0,5-20	0,5
23	Diflubenzuron	35367-38-5	0,5-20	0,5
24	Endosulfan sulfato	1031-07-8	0,5-20	0,5
25	Epoxiconazol	135319-73-2	0,5-20	0,5
26	Etión	563-12-2	0,5-20	0,5
27	Fenazaquin	120928-09-8	0,5-20	0,5
28	Fipronil	120068-37-3	0,5-20	0,5
29	Fluroxipir meptil	69377-81-7	0,5-20	0,5
30	Flutriafol	76674-21-0	0,5-20	0,5
31	Haloxifop metil	69806-40-2	0,5-20	0,5
32	Hexaconazol	79983-71-4	0,5-20	0,5
33	Iprodione	36734-19-7	0,5-20	0,5
34	Isoxadifen etil	163520-33-0	0,5-20	0,5
35	Kresoxim metil	143390-89-0	0,5-20	0,5
36	Linuron	330-55-2	0,5-20	0,5
37	Malaoxon	1634-78-2	0,5-20	0,5
38	Malatión	121-75-5	0,5-20	0,5
39	Metalaxil	57837-19-1	0,5-20	0,5
40	Metidation	950-37-8	0,5-20	0,5
41	Metiocarb	2032-65-7	0,5-20	0,5
42	Metoxifenocida	161050-58-4	0,5-20	0,5

43	Metolacloro	51218-45-2	0,5-20	0,5
44	Metribuzina	21087-64-9	0,5-20	0,5
45	Permetrina	52645-53-1	0,5-20	0,5
46	Picoxistrobin		0,5-20	0,5
47	Pirimifos metil	117428-22-5	0,5-20	0,5
48	Procloraz	29232-93-7	0,5-20	0,5
49	Profenofos	67747-09-5	0,5-20	0,5
50	Propanil	41198-08-7	0,5-20	0,5
51	Propaquizafop	709-98-8	0,5-20	0,5
52	Propiconazol	111479-05-1	0,5-20	0,5
53	Pirimetanil	60207-90-1	0,5-20	0,5
54	Simazina	53112-28-0	0,5-20	0,5
55	Terbacil	122-34-9	0,5-20	0,5
56	Tiabendazol	5902-51-2	0,5-20	0,5
57	Triflumuron	148-79-8	0,5-20	0,5
58	Trifloxiestrobina	64628-44-0	0,5-20	0,5
59	Triticonazol	141517-21-7	0,5-20	0,5

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del Cromatógrafo Líquido con detector de masas tándem triple cuadrupolo Schimadzu 8050. (INE 139)
2.6. Instructivos de uso de balanzas (según corresponda INE 06, INE 07, INE 93 o INE 115)
2.7. Ruta para la preparación de soluciones madre (RIN 35)
2.8. Ruta para la preparación de soluciones mix (RIN 45)
2.9. Ruta para el análisis de plaguicidas en sedimentos (RIN 57)
2.10. Registro de masa de Soluciones madre y mixes (RIN 51)
2.11. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32)
2.12. Instructivo de uso de la bomba de vacío Gast (INE 02)
2.13. Instructivo de uso centrífuga Eppendorf 5810 (Rotor A-4-81) (INE 124)
2.14. Instructivo de uso de desionizador Milli-Q (INE 121)
2.15. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108)
2.16. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental DINACEA (ES 01)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los plaguicidas son extraídos de la matriz sedimento, utilizando acetato de etilo como solvente extractante, en un proceso que es asistido por el uso de ultrasonido y agitación manual. El extracto orgánico es separado de la mezcla y es realizado un clean up de tipo dispersivo, empleado alúmina neutra y sulfato de magnesio anhidro. Finalmente, el extracto es filtrado por 0,22 µm y retomado en un volumen exacto de 1 mL.
3.2. Los analítos se determinan por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas tándem.
3.3. La cuantificación de cada plaguicida se realiza por interpolación del área obtenida en la muestra, en la curva de calibración correspondiente, utilizando para ello la señal de la transición de mayor sensibilidad.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes para la manipulación de la muestra.
4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. En caso de presentarse una interferencia por parte de la matriz, que coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (de cuantificación o confirmación) se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación.
5.2. Las interferencias producto de la matriz que repercuten en la recuperación de algunos analítos, es compensadas por el uso de curva de calibración en matriz.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un frasco de vidrio o teflón, con boca ancha y protección a la luz (color ámbar o forrado con papel aluminio), previamente enjuagada con hexano y acetona. En su defecto utilizar papel de aluminio y posteriormente introducir en una bolsa de nylon. La toma de muestra debe de ser cercana a los 500 g.
6.2. Preservar las muestras a ≤6 °C (>0 °C). El tiempo máximo de almacenamiento son 7 días para la extracción y 40 días para la determinación.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo líquido con detector de espectrometría de masas tándem (triple cuadrupolo) SHIMADZU 8050. En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares, que permita las prestaciones aquí establecidas.
7.2. Columna cromatografía: Shim-pack Velox, C-18, 1.8 µm, 2.1mm x 100mm.
7.3. Balanza de resolución 0,001 g (IN 594 ó IN 20).
7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (IN 417 ó IN 19).
7.5. Viales de vidrio ámbar de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.
7.6. Viales de vidrio ámbar de 12 mL con tapa rosca, con contratapa de PTFE.
7.7. Tubos falcón de 15 y 50 mL.
7.8. Dispensador de botella para volúmenes de 1-10 mL adecuado para solventes (IN 638).
7.9. Desionizador Milli-Q (FQ 605).
7.10. Baño de agua con ultrasonido (IN 554).
7.11. Centrífuga con adaptadores para frascos de 15 y 50 mL. Con una velocidad mínima de giro de 4000 rpm (MB 609).
7.12. Filtro de cartucho de PVDF de 0,22 µm.
7.13. Jeringa de vidrio o descartable de plásticos de 2mL
7.14. Pipetas automáticas regulable de 10 a 100, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

8. REACTIVOS

8.1. Hexano libre de plaguicidas $CH_3(CH_2)_4CH_3$ Nro. CAS 110-54-3 (marca Baker, Mallinckrodt o similar).
8.2. Acetona libre de plaguicidas $(CH_3)_2CO$ Nro. CAS 67-64-1 (Baker, Mallinckrodt o similar).
8.3. Acetato de etilo grado plaguicida $CH_3COOC_2H_5$ Nro. CAS 141-78-6 (Baker, Mallinckrodt o similar).
8.4. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
8.5. Metanol grado plaguicida (Baker, Mallinckrodt o similar).
8.6. Sulfato de magnesio anhidro calidad puro para análisis (ppa).
8.7. Alúmina neutra calidad puro para análisis (ppa).
8.8. Cloruro de sodio calidad puro para análisis (ppa).
8.9. Tetraborato de sodio (Bórax) calidad ppa.

8.10. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la Tabla 1 del presente documento.

8.11. Solución stock de cada plaguicida (concentración aproximada 1000 mg/L): Se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.10.

8.12. Solución stock mix de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 10 mg/L): Se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.11.

8.13. Solución de fortificación de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida de 100 µg/L), preparada a partir de 8.12.

8.14. Argón alta pureza (Ar Nro. CAS 7440-37-1; 99,99 %).

8.15. Nitrógeno (pureza 99,9%)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.

9.2. Todo el material utilizado, tanto para la toma de muestra como para la etapa de extracción, debe enjuagarse previo a su uso con hexano y acetona, libres de plaguicidas. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.

9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

9.4. Control de peso de soluciones estándar: Para las soluciones mencionadas en los puntos 8.11 y 8.12, realizar control de peso antes de usar. Se admite una diferencia de peso máxima de 2% respecto al último valor registrado. En caso de superar este valor, se evaluará la posibilidad de reconstituir al volumen inicial o preparar nuevamente. Luego de utilizar la solución, se registra su nuevo peso en el RIN 51. Este valor es utilizado para la verificación de la solución antes del próximo uso.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La curva de calibración a ser utilizada es preparada sobre matriz blanco (Matrix Match); Para ello, se debe realizar el procedimiento de preparación de muestra utilizando sedimento libre de los analítos de interés y retomando el residuo final en un mix de pesticidas (8.12) en concentraciones crecientes de acuerdo con los rangos de trabajo establecidos en la Tabla 1. En caso de que la matriz empleada para realizar la calibración contenga los analítos de interés, se deberán cuantificar las muestras empleando el método de adiciones estándar. En el caso de preparar diluciones de la solución mix, estas deben ser preparadas al momento de ser utilizadas. La curva debe contar con al menos 3 puntos y la vigencia de la misma es de 1 mes en freezer a – 20 °C.

Nivel de concentración	Volumen de muestra (µL)	Concentración Mix Estándares), (µg/L)	Volumen de Mix Estándares (µL)	Volumen de Acetato de etilo (µL)
0.5	900	10	50	50
1	900	10	100	0
5	900	100	50	50
10	900	100	100	0
20	900	1000	20	80

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

11.1. Homogeneizar la muestra.

11.2. Determinar el % de humedad de la muestra.

11.3. Realizar una toma de (5.0 ± 0,05) g de la muestra y colocarla en un tubo falcón de 50 mL, registrar la toma en la planilla correspondiente.

11.4. Para el caso de muestras con un contenido de humedad menor al 70 %, agregar 10 mL de agua desionizada.

11.5. Agregar 1 g de tetraborato de sodio.

11.6. Agitar vigorosamente (manualmente) durante 30 segundos.

11.7. Agregar 5 mL de acetato de etilo y agitar manualmente durante 1 minuto.

11.8. Agregar 2 g de sulfato de magnesio anhidro y 0,5 g de cloruro de sodio, agitar vigorosamente (manualmente) durante 3 minutos.

11.9. Colocar el batch en un baño de ultrasonido durante 10 min.

11.10. Luego del proceso de agitación, centrifugar a 4000 rpm por 6 minutos.

11.11. Separar 3 mL de sobrenadante en un tubo de 15 mL y adicionar 100 mg de alúmina y 450 mg de sulfato de magnesio anhidro. Agitar manualmente durante 1 minuto.

11.12. Centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 6 minutos.

11.13. Filtrar 1.0 mL del sobrenadante usando jeringa de 2.0 mL (7.13) al vial con filtro 0,22 µm.

Análisis cromatográfico

11.14. Prender el cromatógrafo SHIMADZU 8050 LC-MS/MS. Seleccionar el método Plaguicidas Bifenilo Final y verificar que las condiciones del mismo sean las descriptas a continuación:

*Fase móvil:	Flujo: 0,2 mL /min Sistema desgasificador.		
(Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Canal A: Agua (5mM Formiato de amonio) Canal B: Metanol (5mM Formiato de amonio)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	85	15
Tiempo de corrida: 30 minutos	1	60	40
	3.5	60	40
	6	50	50
	8	45	55
	17,5	5	95
	23	5	95
	24	85	15
	30	85	15

* Inyección:	Volumen inyección del método: 1.5 µL (según el modo de inyección programado, determina un volumen final de 4.5 µL de muestra)
* Columna:	Shim-pack Velox, C-18, 1.8 µm, 2.1mm x 100mm. Temperatura: 40°C.
*Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C. Heat Block Temperature: 400 °C.

*Parámetros del detector MSMS para cada plaguicida a ser determinado. Ver tabla 2

Name	Ret. Time	Transición de cuantificación (target)		Transición de confirmación Ref. (1)		Transición de confirmación Ref. (2)		Polarity	TargetQ1 Pre Bias (V)	Target Collision Energy (eV)	TargetQ3 Pre Bias (V)	Ref.(1) Q1 Pre Bias (V)	Ref.(1) Collision Energy (eV)	Ref.(1) Q3 Pre Bias (V)	Ref.(2) Q1 Pre Bias (V)	Ref.(2) Collision Energy (eV)	Ref.(2) Q3 Pre Bias (V)
		Ión Precursor (m/z)	Ión producto 1 (m/z)	Ión Precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Ión Precursor (m/z)	Ión producto (m/z)										
Alacloro	16,4	270,1	238	270,1	162,2			+	-14	-11	-16	-14	-21	-30			
Ametrina	14,8	228,1	186	228,1	96			+	-12	-19	-19	-12	-26	-17			
Atrazina	13	216,1	174,1	216,1	104,1			+	-24	-13	-18	-24	-30	-20			
Atrazina desetil	7,9	188,1	146,1	188,1	104,1			+	-22	-18	-30	-22	-24	-19			
Atrazina desiso-propil	5,4	174,1	68,2	174,1	104			+	-20	-29	-26	-20	-23	-20			
Azinfos metil	14,1	318	132,1	318	77	318,0	160,2	+	-16	-16	-28	-16	-36	-29			
Azoxiestrobina	14,4	404	372	404	329	404,0	344,0	+	-18	-5	-27	-18	-26	-23			
Bifentrina	21,9	440,2	181,2	440,2	165,1	440,2	166,1	+	-13	-17	-19	-13	-55	-30			
Carbaril	11,7	202,1	145,1	202,1	117,1			+	-22	-12	-28	-22	-25	-22			
Carbofurano	11	222,1	165	222,1	77,2			+	-25	-6	-17	-25	-44	-30			
Carbendazim	8,5	192,1	160,2	192,1	132,3			+	-22	-19	-30	-22	-30	-25			
Clorantraniliprole	14	483,9	452,9	483,9	285,9	483,9	112	+	-14	-19	-22	-14	-17	-30			
Clorpirifos	19,6	350	198	350	97,1	350,0	125,1	+	-18	-21	-20	-18	-33	-17			
Clorpirifos Metil	18,2	324	125,1	324	291,7	324,0	47,20	+	-17	-21	-22	-17	-16	-30			
Clomazone	14,3	239,9	125	239,9	89			+	-12	-11	-23	-12	-48	-16			
Ciproconazol	18,1	375,2	256	375,2	120	375,2	358,05	+	-18	-16	-18	-18	-32	-21			
Cyhalofop butil	16	292,1	70,1	292,1	125,1	292,1	89,0	+	-15	-22	-28	-15	-32	-23			
Cipermetrina	20,3	432,09	191	432,9	416	432	127,2	+	-22	-15	-19	-22	-9	-30	-22	-30	-25
Diazinon	17,4	305,1	169,1	305,1	153			+	-16	-12	-17	-16	-16	-29			
Deltametrina	20,1	523	281	523	505,9	523	181	+	-26	-17	-29	-26	-11	-36			
Diuron	13,5	233,1	72,1	233,1	160			+	-12	-22	-29	-12	-26	-27			
Difenoconazol	19	406,1	250,9	406,1	111			+	-12	-25	-17	-12	-55	-21			
Diflubenzuron	7,8	311	158,1	311	141,05			+	-16	-16	-29	-16	-32	-27			
Endosulfan sulfato	17,5	418,8	97,1	418,8	97	418,8	80,1	-	30	22	20	16	35	19			
Epoxiconazol	16,3	330	121,1	330	101,1			+	-17	-11	-22	-17	-44	-19			
Etión	19,2	385	143	385	198,9			+	-20	-25	-28	-20	-10	-20			
Fenazaquin	20,9	307,2	57	307,2	161,1	307,2	131,2	+	-16	-13	-23	-16	-12	-16			
Fipronil	16,5	435	330	435	250,1			-	16	16	24	16	27	27			
Fluroxipir meptil	19,7	367,1	255	367,1	209	367,1	180,9	+	-11	-12	-26	-11	-24	-21			
Flutriafol	13,8	302,1	70,1	302,1	123			+	-15	-22	-28	-15	-26	-22			
Haloxifop metil	18,1	376,1	316	376,1	91,1	376,1	272	+	-11	-8	-22	-11	-27	-16	-11	-36	-28
Hexaconazol	18,2	314,1	70	314,1	159			+	-16	-22	-27	-16	-30	-30			
Iprodione	16,5	330,1	121,1	330,1	101,1			+	-9.8	-21.9	-9,8	-24,9	-36	-37,4			
Isoxadifen etil	16,9	296,1	232	296,1	263			+	-15	-12	-24	-15	-12	-28			
Kresoxim metil	17	314,1	267	314,1	116,2	314,1	235,0	+	-16	-8	-18	-16	-22	-22			
Linuron	14,7	248,8	160	248,8	182,1	248,8	133,1	+	-12	-18	-30	-12	-16	-18			
Malaoxon	11,1	315,1	98,9	315,1	127,2			+	-16	-14	-18	-16	-7	-23			
Malatión	15,4	348,1	127,1	348,1	99	348,1	330,9	+	-10	-17	-24	-10	-25	-19	-10,0	-8,0	
Metalaxil	13,4	280,1	220	280,1	192,1	280,1	160,1	+	-14	-6	-22	-14	-13	-20			
Metidation	15,4	320	145	320	84,9	320,0	302,8	+	-16	-12	-27	-16	-27	-15			
Metiocarb	14,9	226,3	121,1	226,3	169,1			+	-26	-19	-23	-26	-10	-17			
Metoxifenocida	15,4	369,2	149,1	369,2	91,2	369,2	313,0	+	-19	-8	-30				-19,0	-9,0	-21,0
Metolacloro	16,6	284,1	252,1	284,1	176,1	284,1	134,2	+	-14	-6	-17				-14	-32,0	-24,0
Metribuzina	11	215,1	187,1	215,1	49,1			+	-23	-18	-19	-23	-26	-19			
Permetrina	21.1	408	183,1	408,1	355,1	408,1	153,1	+	-12	-21	-19	-12	-10	-26			
Picoxistrobin	16,6	368	145,1	368	205			+	-19	-12	-28	-19	-5	-21			
Pirimifos metil	17,9	306,1	164,1	306,1	67			+	-17	-18	-17	-17	-40	-27			
Prochloraz	17,7	376	308	376	70			+	-11	-8	-21	-11	-26	-29			
Profenofos	18,7	375	304,7	375	346,8	375	128,1	+	-11	-19	-21	-11	-13	-24			
Propanil	14,8	218	162	218	127	218,0	57,1	+	-24	-14	-17	-24	-24	-25			
Propaquizafop	20	444,1	70,2	443,8	100,2			+	-21	-22	-20	-21	-42	-28			
Propiconazol	17,4	342	158,9	342	69,1	342,0	41,0	+	-17	-28	-16	-17	-22	-27			
Pirimetanil	15,1	200,1	107	200,1	77,1			+	-21	-24	-19	-21	-44	-30			
Simazina	10,9	202,1	104	202,1	68,1	202,1	132,1	+	-23	-25	-19	-23	-32	-27			
Terbacil	11,4	215,1	159,1	215,1	42,2	215,1	73,0	-	15	16	30	15	27	15			
Tiabendazol	10	202,2	175	202,2	131,2			+	-22	-15	-18	-22	-27	-24			
Triflumuron	18,2	359,1	156,05	359,1	139,05			+	-14	-17	-26	-14	-34	-23			
Trifloxiestrobina	18,1	409,1	186,1	409,1	145,1	409,1	205,9	+	-20	-6	-19	-20	-29	-29	-20,0	-10,0	-21,0
Triticonazol	16,2	318,1	70,2	318,1	125	318,1	191,2	+	-16	-22	-28	-16	-28	-23			

• El voltaje de la interface puede variar de acuerdo al tunning del equipo.

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las soluciones estándar en matriz, se grafica para cada plaguicida, el área de la transición de mayor sensibilidad en función de la concentración. Para el rango de trabajo definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde "y" es el área del plaguicida y "x" la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se comparan los cromatogramas de muestra y estándar, y en caso de presunto positivo, se evalúan los requerimientos cromatográficos y de espectrometría de masas, establecidos en el Guía DG-SANTE vigente para la identificación del mismo. Ver PGC 01 sección "Criterios de identificación de compuestos para métodos multiresiduos por LC MS/MS"

12.3. La concentración de cada plaguicida en la muestra, se calcula interpolando el área del cromatograma de muestra, en la curva de calibración en matriz correspondiente.

$$C_{\text{plaguicida i}}, \text{extracto (µg/L)} = \frac{(\text{Área plaguicida i, extracto}) - b}{A}$$

Siendo i= analito de interés.

a y b corresponden a la pendiente y ordenada en el origen, de la recta de mejor ajuste.

12.4. La concentración de cada plaguicida en la muestra, en µg/L, se calcula según:

$$C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra (µg/L)} = \frac{C_{\text{plaguicida i}}, \text{extracto x V final}}{\text{T muestra corregida por humedad}}$$

donde:

C plaguicida i, extracto: es la concentración de cada plaguicida, en µg/L, calculada según 12.3

V final: volumen final del extracto, en mL.

T muestra corregida por humedad: toma de muestra*(100- Humedad de la muestra en %) /100, en g.

12.5.

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra fortificada (µg/L)} - C_{\text{plaguicida i}}, \text{muestra (µg/L).}}{C_{\text{plaguicida i}}, \text{esperada de la muestra fortificada.}}$$

donde:

Cplaguicida i, muestra fortificada: Concentración del plaguicida i calculada según 12.4, en la muestra fortificada.

Cplaguicida i, muestra: Concentración del plaguicida i en la muestra sin fortificar, calculada según 12.4

Cplaguicida i, esperada de la muestra fortificada: Concentración teórica calculada a partir del volumen y la concentración del Mix utilizado para la fortificación y volumen de muestra fortificado.

Nota: Es posible operar con concentraciones debido a que el volumen final es el mismo en las tres soluciones.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza un blanco de reactivos y un blanco de matriz, extraídos ambos en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que los cromatogramas no contengan señales que interfieran con los compuestos de interés. Además, se verificará que el solvente utilizado para la reconstitución final de las muestras no presente contaminantes que interfieran en la determinación.

13.2. **Control de veracidad de la determinación:** Evaluar la veracidad de la determinación, realizando una fortificación de una muestra perteneciente al batch, al nivel del límite de cuantificación o reporte del analito de interés, cada 5 muestras. Para el caso de batch de análisis menores a 5 muestras, se deberá realizar como mínimo un fortificado.

El porcentaje de recuperación calculado deberá estar entre 60-140 %.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

Modo de preparación: En un tubo plástico de 50mL realizar una toma por peso de la muestra a fortificar y adicionar un volumen adecuado de Solución stock mix de plaguicidas (8.12) o una dilución del mismo, tal que la concentración final obtenida sea igual al límite de cuantificación o reporte del método. Se agita el tubo durante 10 segundos para homogeneizar la solución y se deja reposar durante 10 minutos. Finalmente se procede con la extracción de la muestra desde el punto 11.4.

13.3. **Control de precisión:** Se debe de realizar un duplicado cada 5 muestras pertenecientes al batch de analisis. Para el caso de batch de análisis menores a 5 muestras, se deberá realizar como mínimo un duplicado. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 20 % para cada plaguicida.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. Anastassiades, M. et al (2003). "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/ Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce". Journal of AOAC International, 86(2), 412-431.

14.2. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (Documento SANTE/11312/2021).

8094UY

Determinación de Glifosato, Ácido Aminometilfosfónico (AMPA) y Glufosinato de Amonio en matrices líquidas por inyección directa, usando Cromatografía Líquida acoplada a detector de masas tándem

Elaborado - R. Souza, V. Muñoz

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es utilizada para la determinación de Glifosato, Acido Aminometilfosfónico (AMPA) y Glufosinato de Amonio en matrices líquidas. En la Tabla 1 se incluyen los rangos de trabajo y el límite de cuantificación (LOQ).

Tabla 1: Lista de plaguicidas incluidos en este procedimiento, incluyendo rango de trabajo y LOQ.

Name	Nombre	Nº CAS	Rango de trabajo aguas (µg/L)	Límite de Cuantificación aguas (µg/L)	Rango de trabajo efluentes (µg/L)	Límite de Cuantificación efluentes (µg/L)
Glyphosate	Glifosato	1071-83-6	1.0 - 50	1.0	5.0 - 250	5.0
Aminomethylphosphonic Acid (AMPA)	Ácido Aminometilfosfónico (AMPA)	1066-51-9	1.0 - 50	1.0	5.0 - 250	5.0
Ammonium Gluphosinate	Glufosinato de amonio	77182-82-2	1.0 - 50	1.0	5.0 – 250	5.0

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA.

2.5. Instructivo de uso del Cromatógrafo Liquido con detector de masas tándem triple cuadupolo Shimadzu 8050 (INE 139).

2.6. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121).

2.7. Instructivo para el uso del destilador (INE 109).

2.8. Instructivo de uso de balanzas (INE 07, INE 06).

2.9. Ruta para el análisis de plaguicidas en aguas naturales por inyección directa (RIN 55).

2.10. Ruta de preparación de soluciones madres estándares (RIN 35).

2.11. Ruta de preparación de Mixes (RIN 45).

2.12. Registro de masa de soluciones madre y mixes (RIN 51).

2.13. Registro de patrones calibrados y equipos controlados (RGC 32).

2.14. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizada en el Laboratorio Ambiental de DINACEA (ES 01).

2.15. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 69)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. El presente método describe el análisis simultáneo de los compuestos de la Tabla 1, mediante la dilución de la muestra con agua desionizada (8.2) filtrado e inyección directa en el cromatógrafo líquido con detector de espectrometría de masas tándem.

3.2. La cuantificación de cada plaguicida, se realiza por interpolación del área en la curva de calibración en la matriz correspondiente, utilizando para ello la señal de la transición de mayor sensibilidad.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

4.1. Usar túnica, guantes y lentes para las actividades vinculadas al análisis.

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

4.3. Todos los solventes se deben manipular bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

5.1. En caso de presentarse una interferencia por parte de la matriz, que coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (de cuantificación o confirmación) se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación establecidos en el PGC01 Procedimiento de validación de técnicas.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar la muestra en un frasco de 50mL de polietileno o polipropileno, previamente enjuagado con agua desionizada y etanol.

6.2. Preservar las muestras a temperatura ≤ 6 °C (> 0 °C). El tiempo máximo de almacenamiento son 7 días.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo líquido con detector de espectrometría de masas tándem (triple cuadrupolo) SHIMADZU 8050. En caso de utilizar otro cromatógrafo, el mismo deberá contar con características similares, que permita las prestaciones definidas en este documento.

7.2. Columna de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) Termo Acclaim Trinity Q1 3.0 µm, 2.1 mm x 100 mm.

7.3. Balanza de resolución 0,00001 g y 0,001 g.

7.4. Matraces aforados 10,00 mL.

7.5. Vórtex.

7.6. Jeringa de vidrio o descartable de plástico de 2 mL.

7.7. Viales de vidrio de 2, 4 y 12 mL con tapa rosca y septo de PTFE.

7.8. Tubos plásticos de 2, 10, 15 y 50 mL.

7.9. Pipetas automáticas regulable de 10 a 100 µL, 100 a 1000 µL y 1 a 10 mL.

7.10. Filtro de cartucho de PVDF 0,22 µm.

7.11. Desionizador de agua (Millipore Elix Escentials o similar).

7.12. Baño de agua con ultrasonido.

8. REACTIVOS

8.1. Acetonitrilo calidad HPLC (Nro. CAS 75-05-8).

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

8.3. Acido Fórmico calidad HPLC (Nro. CAS 64-18-6).

8.4. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la Tabla 1 del presente documento.

8.5. **Solución stock madre individual de cada plaguicida** (concentración aproximada 1000 mg/L): Preparar según PGC 22, Procedimiento de preparación de soluciones de referencia para el análisis multiresiduos de plaguicidas.

8.6. **Solución stock mix de plaguicidas** (concentración aproximada de cada plaguicida 1000 µg/L): Preparar según PGC 22, Procedimiento de preparación de soluciones de referencia para el análisis multiresiduos de plaguicidas.

8.7. Argón de alta pureza (Ar Nro. CAS 7440-37-1; 99,99 %).

8.8. Etanol absoluto 99.5% (CAS Nro. 64-17-5)

Nota 1: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 2: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar contaminación cruzada de las muestras durante la manipulación.

9.2. Todo el material que será utilizado, tanto para la toma de muestra, como para las demás etapas del análisis, debe enjuagarse previo a su uso con agua desionizada y etanol, libres de plaguicidas. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.

9.3. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas, deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

9.4. Control de peso de soluciones estándar: Para las soluciones mencionadas en los puntos 8.5 y 8.6, realizar control de peso antes de usar. Se admite una diferencia de peso máxima de 2% respecto al último valor registrado. En caso de superar este valor, se evaluará la posibilidad de reconstituir al volumen inicial o preparar nuevamente. Luego de utilizar la solución, se registra su nuevo peso en el RIN 51. Este valor es utilizado para la verificación de la solución antes del próximo uso.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Para preparar las curvas de calibración en matriz, se realiza el procedimiento de preparación de muestra utilizando matriz libre de los analítos de interés y se agrega la cantidad apropiada de un mix de plaguicidas (8.6) o diluciones del mismo en concentraciones crecientes, de acuerdo con los rangos de trabajo establecidos en la Tabla 1 y de manera que el punto más bajo de la curva de calibración, corresponda al límite de reporte y/o límite de cuantificación. La curva de Matrix Match debe contener como mínimo 3 niveles de concentración. De igual manera preparar un cero de curva, a partir de la muestra blanco y agua desionizada. Siempre se debe mantener la relación muestra:reactivos en una relación 9:1.

Tabla 2. Esquema de preparación de curva de calibración Matrix Match.

Nivel de concentración µg/L	Volumen de muestra (µL)	Concentración Mix Estándares), (µg/L)	Volumen de Mix Estándares (µL)	Volumen de ácido fórmico (µL)	Volumen de Agua (µL)
1	900	10	95	5	0
5	900	100	50	5	45
10	900	100	95	5	0
20	900	1000	20	5	75
30	900	1000	30	5	65
50	900	1000	50	5	45

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

11.1. Homogeneizar la muestra.

11.2. Cuando la matriz a analizar es un efluente la muestra se debe diluir al 20% en agua 8.2 (1/5), para el caso de aguas naturales se trabaja sin dilución.

11.3. Tomar 900 µL de muestra en un tubo plástico de volumen adecuado, adicionar 5 µL de ácido fórmico (8.3) y 95 µL de agua desionizada (8.2). Es posible tomar una porción mayor de muestra si se mantiene la relación de muestra:reactivos.

11.4. Seguidamente se agita en un vortex durante 30 segundos, se coloca en baño de ultrasonido 1 minuto y se filtra mediante un filtro de 0,22 µm y jeringa (7.6) a un vial de 2 mL.

11.5. Inyectar en el Cromatógrafo. La secuencia de inyección deberá estar diseñada de la siguiente manera: un estándar preparado en solvente, curva de calibración en matriz, muestras, controles de calidad y nuevamente la curva de calibración.

Análisis cromatográfico

11.6. Prender el cromatógrafo SHIMADZU 8050 LC-MS/MS. Seleccionar el método Glifosato2022.lcm y verificar que las condiciones de este sean las descriptas a continuación:

*Fase móvil:	Flujo: 0,5 mL /min Sistema desgasificador.		
(Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Canal A: Agua (0,5 % ácido fórmico) Canal B: Acetonitrilo (0,5 % ácido fórmico)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	35	65
Tiempo de corrida: 40 minutos	2	35	65
	2.1	90	10
	9	90	10
	9.1	35	65
	13	35	65

* Inyección:	Volumen inyección del método: 6.0 µL (según el modo de inyección programado, determina un volumen final de 18 µL de muestra)
* Columna:	(HILIC) Termo Acclaim Trinity Q1 3.0 µm, 2.1 mm x 100 mm. Temperatura: 40 °C.
*Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 300 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C. Heat Block Temperature: 400 °C. Collision gas pressure: 320 Kpa

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación utilizando el detector de triple cuadrupolo

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada plaguicida, su área en función de la concentración. Para el rango de trabajo definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde "y" es el área de la señal del plaguicida y "x" la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L. Podrán utilizarse opciones de algoritmos de ponderación del software del equipo, como 1/Concentración para obtener una mejor regresión lineal.

12.2. Se comparan los cromatogramas de muestra y estándar, y en caso de presunto positivo, se evalúan los requerimientos cromatográficos y de espectrometría de masas, establecidos en el Guía DG-SANTE vigente para la identificación del mismo. Ver PGC 01 sección "Criterios de identificación de compuestos para métodos multiresiduos por LC MS/MS".

12.3. La concentración de cada plaguicida en la muestra, se calcula interpolando el área en el cromatograma de la muestra, en la curva de calibración en matriz correspondiente.

$$C_{\text{plaguicida i, muestra dil}}\ (\mu g/L) = \frac{(\text{Área}_{\text{plaguicida i, muestra dil}}) - b}{a}$$

donde:

i= analito de interés.

a y b corresponden a la pendiente y ordenada en el origen respectivamente de la recta de mejor ajuste.

Tabla 3. Parámetros del detector MS/MS

Name	Ret. Time	Transición de cuantificación (target)		Transición de confirmación Ref. (1)		Transición de confirmación Ref. (2)		Polarity	TargetQ1 Pre Bias (V)	Target Collision Energy (eV)	TargetQ3 Pre Bias (V)	Ref.(1) Q1 Pre Bias (V)	Ref.(1) Collision Energy (eV)	Ref.(1) Q3 Pre Bias (V)	Ref.(2) Q1 Pre Bias (V)	Ref.(2) Collision Energy (eV)	Ref.(2) Q3 Pre Bias (V)
		Ión Precursor (m/z)	Ión producto 1 (m/z)	Ión Precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Ión Precursor (m/z)	Ión producto (m/z)										
Glifosato	6.2	167.9	63	167.9	150.1	-	-	-	21	23.1	22	24	13.3	27			
Ácido Aminometilfosfónico (AMPA)	1.2	110	79	110	63	110	81	-	22	27.1	32	21	21.2	23	22	14.7	20
Glufosinato de amonio	3.6	179.95	63	179.95	95	179.95	85.05	-	20	37.7	25	20	16.6	20	20	20.8	20

• El voltaje de la interface puede variar de acuerdo al tunning del equipo

12.4. La concentración de cada plaguicida en la muestra, en µg/L, se calcula según (ajuste por el paso de dilución en la preparación):

$$C_{\text{plaguicida i, muestra (µg/L)}} = C_{\text{plaguicida i, muestra dil}} \times F_{dil}$$

donde:

$C_{\text{plaguicida i, muestra dil}}$: es la concentración de cada plaguicida, en µg/L, calculada según 12.3

F_{dil}: Factor de dilución de la muestra

12.5. La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{C_{\text{plaguicida i, muestra fortificada (µg/L) x Vol (mL)}} - C_{\text{plaguicida i, muestra (µg/L) x Vol (mL)}}}{C_{\text{plaguicida i, solución estándar (µg/L) x Vol estándar (mL)}}}$$

donde:

$C_{plaguicidai}$, muestra fortificada: Concentración del plaguicida i calculada según 12.4, en la muestra fortificada.

$C_{plaguicidai}$, muestra: Concentración del plaguicida i en la muestra sin fortificar, calculada según 12.4.

$C_{plaguicidai}$, solución estándar: Concentración del Mix utilizado para fortificar la muestra.

Vol (mL): Volumen de toma de muestra en mL.

Vol estándar (mL): Volumen de toma de solución estándar en mL.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de veracidad del método:**

Evaluar la veracidad de la determinación, realizando la fortificación de muestras pertenecientes al batch, al nivel del límite de cuantificación o reporte del analito de interés. Para el caso de la matriz aguas, realizar un fortificado cada 5 muestras y en el caso de la matriz efluentes, realizar un fortificado por muestra. Para el caso de batch de análisis de la matriz aguas, menores a 5 muestras, se deberá realizar como mínimo un fortificado.

El porcentaje de recuperación calculado deberá estar entre 60-140 %.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.

Modo de preparación: En un tubo plástico de 15 mL realizar una toma de la muestra a fortificar y adicionar un volumen adecuado de Solución stock mix de plaguicidas (8.6) o una dilución del mismo, tal que al menos la concentración final obtenida de un fortificado, sea igual al límite de cuantificación o reporte del método. Se agita el tubo durante 10 segundos para homogeneizar la solución y finalmente se deja reposar durante 10 minutos.

13.2. **Control de precisión de la determinación:**

Se deberá realizar un análisis por duplicado cada 5 muestras en el caso de la matriz aguas y un duplicado por muestra en el caso de efluentes. Para el caso de batch de análisis menores a 5 muestras, se deberá realizar como mínimo un análisis por duplicado. La dispersión relativa estándar expresada en forma porcentual (RSD) deberá ser menor o igual a 20 %.

En caso de no cumplir, evaluar la repetición del análisis.

13.3. **Control de blancos:**

En cada corrida, se analiza un blanco de matriz extraído, en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que el cromatograma blanco no contenga señales que interfieran con los compuestos de interés.

14. BIBLIOGRAFÍA

14.1. EPA Method 538, Determination of selected organic contaminants in drinking water by direct aqueous injection -Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (DAI-LC/MS/MS), EPA Document #: EPA/600/R-09/149, versión 1, Noviembre 2009.

14.2. European commission directorate-general for health and food safety. “Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed” (SANTE/11312/2021).

14.3. ISO 21458:2008 Water Quality - Determination of glyphosate and AMPA – Method using High Performance Liquid Chormatography (HPLC) with tandem mass spectrometry, version 1, Diciembre 2008.

14.4. Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. L. Pareja, M.J. Martínez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen and A.R. Fernández-alba, J. Chromatogr. A, 1218, 4790 (2011).

8095UY

Determinación de plaguicidas de alta polaridad en peces

Extracción de plaguicidas mediante método de QuEChERS acidificado y posterior determinación mediante cromatografía líquida acoplada a detectores de masas tándem (LC-MS/MS)

Elaborado - R. Souza

Modificado - No aplica

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Departamento de Análisis Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental

1. APLICACIÓN

1.1. Esta normativa técnica es aplicable para la determinación de 17 plaguicidas en muestras de pez entero, en los rangos de trabajo especificados a continuación (sujeto a disponibilidad de estándares)

Name	Nombre	Nº CAS	Límite de cuantifi-cación (µg/kg)	Rango de trabajo (µg/L)
2,4-D	2,4-D	94-75-7	0,5	0.5-30
Acephate	Acefato	30560-19-1	0,5	0.5-30
Cyhalofop Butyl	Cialofop Butil	122008-85-9	0,5	0.5-30
Diclosulam	Diclosulam	145701-21-9	0,5	0.5-30
Diuron	Diuron	330-54-1	0,5	0.5-30
Flumetsulam	Flumetsulam	98967-40-9	0,5	0.5-30
Fluoxypyr-1-Meptyl-Heptyl Ester	Fluoxypyr-1-Meptyl-Heptyl Ester	81406-37-3	0,5	0.5-30
Fomesafen	Fomesafen	72178-02-0	0,5	0.5-30
Haloxyfop Methyl	Haloxifop Metil	69806-40-2	0,5	0.5-30
Imazapyr	Imazapir	81334-34-1	0,5	0.5-30
Imazethapyr	Imazetapir	81335-77-5	0,5	0.5-30
Linuron	Linuron	330-55-2	0.5	0.5-30
Metsulfuron Methyl	Metsulfuron Metil	74223-64-6	0,5	0.5-30
Propanil	Propanil	709-98-8	0,5	0.5-30
Pyrazosulfuron Ethyl	Pirazosulfuron Etil	93697-74-6	0.5	0.5-30
Pyrimethanil	Pirimetanil	53112-28-0	0,5	0.5-30

Tabla 1- Listado de plaguicidas incluidos en la presente metodología analítica.

2. REFERENCIAS

2.1. Manual de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.2. Manual de Gestión de Calidad - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.3. Manual de Control de Calidad Analítico - Laboratorio Ambiental DINACEA
2.4. Carpeta de funcionamiento y mantenimiento de equipos – Laboratorio Ambiental DINACEA
2.5. Instructivo de uso del cromatógrafo liquido acoplado a detector de masas tándem Shimadzu 8050
2.6. Instructivos de uso de balanzas (según corresponda INE 06, INE 07, INE 93 o INE 115)
2.7. Ruta para la preparación de soluciones madre (RIN 35)
2.8. Ruta de análisis de plaguicidas en matrices sólidas (RIN 57)
2.9. Registro de masa de Soluciones madre y mixes (RIN 51)
2.10. Ruta para la preparación de soluciones mix (RIN 45)
2.11. Instructivo de uso de centrífuga Eppendorf 5810 (Rotor A-4-81) (INE 124)
2.12. Instructivo de uso de concentrador de muestras Labconco modelo RapidVap (INE 127)
2.13. Instructivo de uso de desionizador Millipore Elix Escentials (INE 121)
2.14. Instructivo de uso de baño de agua con ultrasonido (INE 108)
2.15. Instructivo de uso de mufla (INE 27)
2.16. Instructivo de uso de estufa (INE 107, INE 101)
2.17. Instructivo para el uso del destilador (INE 109)
2.18. Especificaciones mínimas de calidad para reactivos y agua utilizadas en el laboratorio ambiental de DINACEA. (ES01)
2.19. Procedimiento de Limpieza de Material (PR 16)
2.20. Instructivo de uso del molino de cuchillas RESCH GM200 (INE 148)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

3.1. Los plaguicidas son extraídos de la matriz peces utilizando acetonitrilo acidificado (1% de Ácido Fórmico) como solvente extractante. El proceso es asistido por agitación mecánica, cloruro de sodio y sulfato de magnesio. La separación de fases es favorecida por centrifugación. Finalmente, el extracto es purificado mediante extracción en fase solida dispersiva con sulfato de magnesio y octadecilsilano (RP C-18).

3.2. Los analitos se determinan por cromatografía líquida con detector de masas tándem (LC-MS/MS).

3.3. La cuantificación de cada plaguicida, se realiza por interpolación del área de la señal cromatográfica, en la curva de calibración correspondiente.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

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

4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.

5. INTERFERENCIAS

5.1. El detector empleado en el presente método es altamente selectivo. A pesar de esto los co-extractivos de la matriz pueden producir interferencias que alteran la señal. El uso de calibración con matriz disminuye los errores producto de esta interferencia. Sin embargo se recomienda poner especial énfasis en la etapa de purificación del extracto para evitar potenciales errores en la calibración y preservar el sistema instrumental.

5.2. En caso de que una interferencia por parte de la matriz, coincida con alguna de las transiciones características del compuesto (cuantificación o identificación) y tenga un efecto tal que no pueda ser disminuido con el uso de curva en matriz, se deberá seleccionar una transición alternativa, que permita cumplir con los criterios de identificación y confirmación, establecidos en el PGC01 Procedimiento de validación de técnicas.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar 50 g de muestra en papel aluminio. Conservar las muestras a 4º C hasta el arribo de las mismas al laboratorio.

6.2. Preservar las muestras congeladas a – 20º C hasta la fecha de análisis. El tiempo máximo de almacenamiento son 21 días para la extracción.

Nota 1: En los casos en que no se pudiera llegar a la cantidad de muestra solicitada, esta nunca debes de ser menor a 20g.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Cromatógrafo líquido acoplado a detector de masas tándem marca Shimadzu, modelo 8050.

7.2. Columna cromatográfica Shimadzu Shim pack Velox C18 1.8 µm 2.1 x 100 mm o similar.

7.3. Balanza de resolución 0,001 g (IN 594 ó IN 20).

7.4. Balanza de resolución 0,0001 g (FQ 417).

7.5. Viales de vidrio ámbar de 2 mL con precinto o tapa rosca, con septo de PTFE.

7.6. Viales de vidrio ámbar de 12 mL con tapa rosca, con contratapa de PTFE.

7.7. Insertos cónicos de vidrio de 300 µL, compatibles con viales de 2 mL.

7.8. Pipetas automáticas de 100, 1000 y 10000 µL.

7.9. Desionizador Millipore Elix Escentials (FQ 605).

7.10. Tubos tipo Falcon de 15 y 50 mL con tapa rosca.

7.11. Centrífuga con adaptadores para tubos de 50 y 15 mL (MB 609).

7.12. Vortex.

7.13. Pipetas pasteur de vidrio.

7.14. Concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2 (IN 610).

7.15. Tubos de vidrio con fondo cónico para concentrador de muestras por evaporación con arrastre de N_2.

7.16. Jeringa de vidrio o descartable de plástico de 2 mL.

7.17. Filtro de cartucho de PVDF de 0,22 µm de diámetro de poro, hidrofílico.

7.18. Molino de cuchillas RESTSCH GM200 (IN 689).

7.19. Mufla (FQ 146).

8. REACTIVOS

8.1. Acetonitrilo calidad HPLC (Nro. CAS 75-05-8).

8.2. Acetato de etilo grado plaguicida (Nro. CAS 141-78-6).

8.3. Hexano libre de plaguicida (Nro. CAS 110-54-3).

8.4. Acetona libre de plaguicida (Nro. CAS 67-64-1).

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

8.6. Metanol grado plaguicida (Nro. CAS 67-56-1).

8.7. Sulfato de magnesio anhidro calidad ppa (Nro. CAS 7487-88-9).

8.8. Cloruro de sodio calidad ppa (Nro. CAS 7647-14-5).

8.9. Primary and secondary amines (PSA) (Nro. CAS 111-39-7).

8.10. Octadecil Silano (C18) (Nro. CAS 71889-02-6).

8.11. Formiato de amonio (Nro. CAS 540-69-2).

8.12. Materiales de referencia certificados correspondientes a cada plaguicida listados en la Tabla 1 del presente documento.

8.13. Solución stock de cada plaguicida (concentración aproximada 1000 mg/L): Se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.12.

8.14. Solución stock mix de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida 10 mg/L): Se prepara según lo establecido en el punto 5.2 del PGC 22, a partir de 8.13.

8.15. Solución de fortificación de plaguicidas (concentración aproximada de cada plaguicida de 100 µg/L), preparada a partir de 8.14.

8.16. Nitrógeno (pureza 99.9%).

8.17. Argón de alta pureza (99.998 %).

8.18. Detergente no alcalino para limpieza (Extran o similar).

Nota 2: En el resto del presente documento se hará referencia a estos reactivos por su numeral o nombre.

Nota 3: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. (ES01)

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. Evitar la contaminación cruzada de la muestras durante la manipulación.

9.2. Las soluciones de descarte contaminadas con plaguicidas deben disponerse en envases destinados para tal fin y debidamente rotulados.

9.3. Todo el material que será utilizado para la etapa de extracción y purificación, en caso de ser reutilizado, debe ser lavado con agua y detergente no alcalino y enjuagarse previo a su uso, con acetona libre de plaguicidas. El material de vidrio debe de ser muflado previo a su uso. Siempre que sea posible trabajar con material descartable.

9.4. Restos de jabón (dodecil sulfato de sodio): genera un pH básico en la superficie del material de vidrio, el cual puede degradar parcialmente algunos analitos incluidos en el alcance (especialmente compuestos organofosforados).

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. La calibración se realiza mediante una curva preparada en matriz (Matrix Match Calibration) a fin de compensar el efecto de la misma sobre los plaguicidas de interés. Realizar la extracción de al menos 2 porciones de una matriz blanco, en forma análoga a las muestras. En la etapa de reconstitución del extracto final se agrega la cantidad correspondiente de solución mix de plaguicidas (8.12) o una dilución, empleando pipetas (7.8), de manera de obtener distintas concentraciones que cubran todo el rango lineal. En todos los casos se mantiene el volumen final de 1 mL. En el caso de preparar diluciones de la solución mix, estas deben ser preparadas al momento de ser utilizadas. La vigencia de la curva es de 1 mes en freezer a – 20 °C.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Toma de muestra y extracción

11.1. Homogeneizar la muestra con el molino de cuchillas (IN 689).

11.2. Realizar una toma de aproximadamente 5.0 g en un tubo tipo Falcon de 50 mL (7.10), utilizando la balanza (7.3). Registrar el peso en el RIN 57.

11.3. Agregar 10 mL de acetonitrilo acidificado con ácido formico 1% y agitar manualmente durante 1 minuto, dejar reposar.

11.4. Agregar 1.5 g de cloruro de sodio y 4.0 g de sulfato de magnesio. Agitar manualmente durante 4 minutos.

11.5. Posteriormente centrífugar las muestras a 3200 rpm durante 10 minutos.

11.6. Extraer 7 mL de la capa orgánica a un tubo tipo Falcon de 15 mL (7.10), empleando para ello una pipeta automática de 10 mL (7.8). Evitar el pasaje de fase acuosa y sólidos.

11.7. Agregar 220 mg de C18 y 1.0 g de sulfato de magnesio. Agitar en vortex (7.12) durante 45 segundos.

11.8. Centrifugar el extracto a 3800 rpm durante 10 minutos.

11.9. Filtrar 1.0 mL del sobrenadante usando una jeringa de 2.0 mL (7.15) y filtro de PVDF de 0.2 µm (7.16).

11.10. Inyectar en el cromatógrafo líquido acoplado a detector de masas tándem (7.1).

Análisis cromatográfico

11.11. Prender el cromatógrafo SHIMADZU 8050 LC-MS/MS. Seleccionar el método Glifosato2022.lcm y verificar que las condiciones de este sean las descriptas a continuación:

*Fase móvil:	Flujo: 0,4 mL /min Sistema desgasificador.		
(Verificar las posiciones en los canales de cada fase a utilizar)	Canal A: Agua (5mM Formiato de amonio) Canal B: Metanol (5mM Formiato de amonio)		
Condiciones de gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	98	2
Tiempo de corrida: 17 minutos	0.5	50	50
	2.5	45	55
	5.5	25	75
	7.5	15	85
	8.3	0	100
	13	0	100
	13.3	98	2
	17	98	2

* Inyección:	Volumen de inyección del método: 1.2 µL (según el modo de inyección programado, determina un volumen final de 4.8 µL de muestra).
* Columna:	Shim pack Velox C18 1.8 µm, 2.1 x 100 mm. Temperatura: 40 °C.
*Detector MS/MS:	Condiciones de ionización: Interface: ESI Voltaje de la Interface :4000 V* Nebulizing Gas Flow: 2 L/min Heating Gas Flow: 10 L/min Interface Temperature: 200 °C. Desolvation Temperature: 355 °C. DL Temperature: 250 °C. Heat Block Temperature: 400 °C.

*Parámetros del detector MS/MS para cada plaguicida a ser determinado. Ver tabla 2

Name	Polarity	m/z(1)	m/z(2)	Ref.(1) m/z(1)	Ref.(1) m/z(2)	Target Dwell Time	Target Q1 Pre Bias	Target CE	Target Q3 Pre Bias	Ref Dwell Time	Ref Q1 Pre Bias	Ref CE	Ref Q3 Pre Bias
2,4-D (2,4-PA)	-	219,2	161	219,2	125	50.0	15.0	14.0	15.0	20.0	15.0	27.0	24.0
Acephate	+	184,0	143	184,0	49	40.0	-20.0	-10.0	-27.0	15.0	-20.0	-22.0	-19.0
Bispiribac Na	+	453,1	297	453,1	179	40.0	-17.0	-19.0	-19.0	15.0	-17.0	-23.0	-17.0
Cyhalofop-butyl	+	375,2	120	375,2	256	40.0	-18.0	-32.0	-21.0	15.0	-18.0	-16.0	-18.0
Diclosulam	+	406,1	161	406,1	378	40.0	-12.0	-27.0	-28.0	15.0	-12.0	-15.0	-26.0
Flumetsulam	+	326,1	129	326,1	109	40.0	-17.0	-27.0	-25.0	15.0	-17.0	-40.0	-18.0
Fluroxypyr-1-meth-ylheptylester	+	367,1	255	367,1	209	40.0	-11.0	-12.0	-26.0	15.0	-11.0	-24.0	-21.0
Fomesafen	+	456,0	344	456,0	223	40.0	-14.0	-15.0	-24.0	15.0	-14.0	-30.0	-15.0
Haloxyfop-methyl	+	376,1	316	376,1	91	40.0	-11.0	-8.0	-22.0	15.0	-11.0	-27.0	-16.0
Imazapyr	+	262,3	217	262,3	69	40.0	-20.0	-20.3	-20.0	15.0	-20.0	-28.1	-24.0
Imazethapyr	+	290,3	245	290,3	177	40.0	-22.0	-21.1	-23.0	15.0	-22.0	-27.3	-33.0
Isoxadifen-ethyl	+	296,1	232	296,1	263	40.0	-15.0	-12.0	-24.0	15.0	-15.0	-12.0	-28.0
Linuron	+	248,8	160	248,8	182	40.0	-12.0	-18.0	-30.0	15.0	-12.0	-16.0	-18.0
Malathion	+	331,0	127	331,0	285	40.0	-26.2	-13.3	-11.1	15.0	-24.9	-8.3	-17.4
Metsulfuron Methyl	+	382,1	167	382,1	199	40.0	-14.8	-17.4	-14.8	15.0	-28.7	-22.2	-18.6
Propaquizafop	+	444,1	70	444,1	100	40.0	-21.0	-22.0	-20.0	15.0	-21.0	-42.0	-28.0
Pyrazosulfuron-ethyl	+	415,1	182	415,1	139	40.0	-12.0	-10.0	-19.0	15.0	-12.0	-42.0	-27.0
Pyrimethanil	+	200,1	107	200,1	77	40.0	-21.0	-24.0	-19.0	15.0	-21.0	-44.0	-30.0

Tabla 2. Parámetros del detector MS/MS para cada compuesto

12. ANÁLISIS DE DATOS

Cuantificación analítica

12.1. A partir de las distintas concentraciones de soluciones estándares inyectadas, se grafica para cada plaguicida, el área del pico correspondiente a la transición de cuantificación en función de la concentración de fortificación del estándar preparado. Para el rango lineal definido, la curva de mejor ajuste corresponde a una recta de la forma y = ax + b, donde “y” es el área del plaguicida y “x” la concentración de dicho plaguicida en la solución estándar, en µg/L.

12.2. Se evalúa la linealidad de la curva de calibración de cada plaguicida, a partir del cálculo de residuales. Se considera un ajuste adecuado, si se obtienen valores de residuales menores al 20 %.

12.3. Se comparan las señales de la muestra y de los estándares, para identificar los compuestos analizados. Los tiempos de retención para los analitos en las muestras extraídas, deben coincidir con los tiempos en los estándares de calibración, dentro de una tolerancia de ± 0.1 minutos. Se deberá de seleccionar como mínimo dos iones productos a partir de un ion precursor y establecer la relación entre las intensidades de estos iones, expresada como razón relativa al ion más intenso. Para las muestras extraídas, esta relación

entre iones debe ser ± 30% de la calculada como promedio de las relaciones de las intensidades de los iones productos, en los estándares de calibración utilizados.

12.4. La concentración de cada plaguicida en el extracto se calcula interpolando su área, en la curva de calibración correspondiente

$$C_{\text{plaguicida i, extracto}}\ (\mu g/L) = \frac{(\text{Área}_{\text{plaguicida extracto i}}) - b}{a}$$

Donde:

C plaguicida i, extracto (µg/L): concentración del plaguicida en µg/L.

a y b: corresponde a los coeficientes de la curva.

Área de plaguicida extracto i: área de la señal de la muestra correspondiente al extracto.

12.5. La concentración final de cada plaguicida en la muestra se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$C\ \text{plaguicida i, muestra}\ (\mu g/kg) = (C\ \text{plagucida i, extracto}) \times (Vsol\ /Mm).$$

Donde:

C plaguicida i, muestra: concentración de plaguicida i en la muestra.

Vsol : Volumen de solvente utilizado en mL

Mm : Masa de muestra

12.6. Es posible realizar una cuantificación utilizando un solo nivel de calibración siempre y cuando el área del analito en la muestra y en el estándar sean similares (dentro de ± 30 %).

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

13.1. **Control de blancos:** En cada corrida, se analiza un blanco de matriz, extraído en las mismas condiciones que las muestras analizadas. Verificar que los cromatogramas no contengan señales que interfieran con los compuestos de interés. Además, se verificará que el solvente utilizado para la reconstitución final de las muestras no presente contaminantes que interfieran en la determinación. Estos controles no se incluyen dentro de los gráficos de control.

13.2. **Control de recuperación de fortificaciones:** Se evalúa la recuperación de todos los analitos de interés, realizando el análisis de un fortificado cada 5 muestras y como mínimo 1 por batch. Para ello, fortificar una muestra con la solución 8.15 de tal forma que para al menos una muestra fortificada, la concentración final corresponda a aproximadamente el límite de cuantificación del método. La recuperación de la adición debe estar dentro del rango 60 -140 % del valor adicionado, o de existir gráficos de control, los rangos serán fijados a partir de éstos. En caso de no cumplimiento, evaluar la posibilidad de informar utilizando límites de reporte.

La recuperación de la fortificación se calcula según:

$$\%\ \text{de recuperación}_{\text{plaguicida i}} = 100 \times \frac{(C_{\text{plaguicida i, Mf}} \times M_{mf}) - (C_{\text{plaguicida i, M}} \times M_{mf})}{(V_{\text{Std Fort}} \times C_{\text{Std fort, plaguicida i}})}$$

donde:

C plaguicida i, Mf : concentración de cada plaguicida en la muestra adicionada, en µg/kg.

Mmf : masa de la muestra fortificada en g.

C plaguicida i, M: concentración de cada plaguicida en la muestra sin adicionar, en µg/kg.

Mmf: masa de la muestra fortificada en g.

V Std Fort: volumen del estándar de fortificación 8.15 adicionado a la muestra, en mL.

C Std fort: concentración del estándar de fortificación 8.15 en µg/L.

13.3. **Control de veracidad de la determinación:** En caso de ser posible, evaluar la veracidad de la determinación (verificación inicial de la calibración del instrumento), utilizando un material de referencia certificado. Dicho control se prepara en forma análoga a los puntos de curva en matriz y a una concentración incluida dentro del rango de calibración. Se incluye como mínimo un control de veracidad por batch de análisis. De ser posible, el material de referencia deberá incluir la totalidad de los plaguicidas a analizar.

La concentración obtenida para cada plaguicida debe estar en el rango 60-140 % o de existir los gráficos de control correspondientes, el rango será fijado a partir de éstos.

Cuando el resultado no se encuentre dentro de los límites permitidos, se debe revisar el procedimiento analítico y evaluar la repetición del análisis.

13.4. **Control continuo de calibración del equipo:** El control de calibración es utilizado para poder identificar posibles cambios de sensibilidad durante la determinación analítica. Para ello se incluye un punto de curva en matriz de concentración intermedia cada 10 inyecciones y al final de la secuencia como mínimo 3 puntos de curva. Se acepta hasta un 30 % de variación de la sensibilidad. Si se obtiene una diferencia de señal mayor al 30 % con respecto a la primera inyección de estándar, evaluar la repetición parcial o total del análisis cromatográfico. Estos controles no se incluyen dentro de los gráficos de control.

13.5. **Control de precisión:** Se debe realizar el análisis de un duplicado cada 5 muestras y como mínimo 1 por batch de muestras. Los límites de aceptación de los duplicados surgen a partir de los gráficos de control correspondientes. En caso de no contar con éstos, se aceptan dispersiones entre los duplicados (como rangos normalizados) menores al 20 %, para cada plaguicida.

14. BIBLIOGRAFÍA

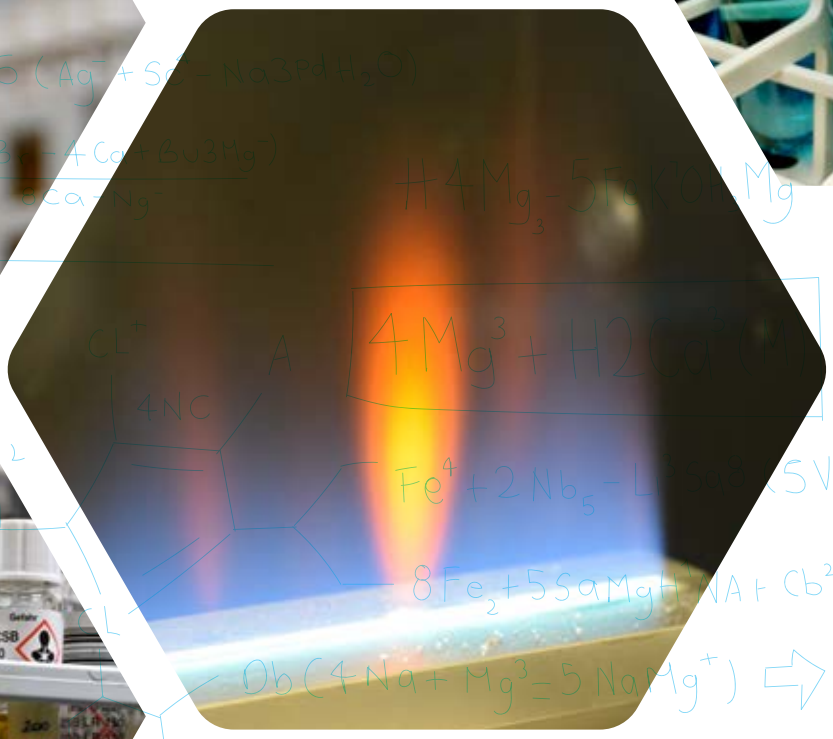
14.1. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC international. 86 (2003) 412–431.

14.2. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (Documento SANTE/11312/2021).









Ministerio
de Ambiente