

## 1. Objetivo

Determinar el contenido de cromo hexavalente en muestras de agua subterránea, superficial y residual, según la norma SM 3500-Cr B método colorimétrico, asegurando la entrega oportuna de resultados confiables a nuestros clientes y su satisfacción en la prestación del servicio.

La metodología desarrollada comprende desde el tratamiento de la muestra hasta la preparación de la curva de calibración y la lectura espectrofotométrica a 540 nm para su posterior cuantificación.

## 2. Alcance

Este método se aplica para el análisis de aguas superficiales, aguas residuales domésticas, aguas residuales no domésticas y aguas subterráneas.

## 3. Referencias Normativas

- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. STANDARD METHODS: For the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition, American Public Health Association 800 I Street, NW. Washington D.C., 2017. ISBN 978-087553-287-5.
- Instructivo para determinar cromo hexavalente en aguas. Gestión de Tecnología de Negocio. Centro de Innovación y Tecnología. Departamento de Servicio Técnico de Laboratorio de Transporte y Transversales. Laboratorio de Aguas y Suelos. Instituto Colombiano de Petróleo.

## 4. Definiciones

- Aguas naturales:** se define como agua natural el agua cruda, subterránea, de lluvia, de tormenta, residual y superficial.
- Analito:** especie química que se analiza.
- Blanco:** agua reactivo o matriz equivalente a la que no se le aplica ninguna parte del procedimiento analítico y sirve para evaluar la señal de fondo.
- Calibración:** conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones, efectuando una corrección del instrumento de medición para llevarlo a las condiciones iniciales de funcionamiento.
- Blanco fortificado:** Trazos gráfico de los resultados de las pruebas con relación al tiempo o secuencia de las mediciones, en donde se establecen límites estadísticos, que pueden ser preventivos, de peligro o de acción
- Curva de calibración:** Función matemática producida por la regresión de las respuestas del detector registradas durante la calibración de un instrumento, utilizando cantidades conocidas de un material de referencia certificado y/o solución de referencia.
- Exactitud:** proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando.
- Material de referencia certificado:** material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de las propiedades están certificados por un procedimiento que establece la trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad, y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.
- Mínima concentración cuantificable (MCC):** la concentración del Analito que produce una señal suficientemente mayor que el blanco, el cual puede ser detectado con un nivel de confianza durante las operaciones de rutina. Típicamente es la concentración que produce una señal 10\*S mayor a la señal del blanco.
- Mínimo nivel de reporte (MRL):** concentración mínima que puede ser reportada como un valor cuantificado para un Analito objetivo en una muestra.
- Muestra:** Parte representativa de la materia objeto del análisis.
- SM:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Solución de Referencia:** Solución preparada a partir de un reactivo grado analítico que contiene el analito a determinar. Solo deben ser empleados para realizar calibraciones y blanco fortificado, ya que no se encuentran presentes los componentes de la matriz que acompañan el analito en las muestras.

## 5. Condiciones Generales.

Las sales de cromo hexavalente Cr (VI) se utilizan ampliamente en procesos industriales del acero, pinturas, colorantes y cerámicas. Las sales de cromo trivalente se utilizan en la industria textil para colorantes, en la industria de la cerámica y el vidrio, en la industria curtidora y en fotografía. El cromo en sus dos estados de oxidación se utiliza en diversos procesos industriales, por tanto, puede estar presente en las aguas residuales de dichas empresas.

El estado hexavalente es tóxico para los humanos, los animales y la vida acuática. Puede producir cáncer de pulmón cuando se inhala y fácilmente produce sensibilización en la piel. Sin embargo, no se conoce si se produce cáncer por la ingestión de cromo en cualquiera de sus estados de oxidación. El rango de lectura del método de cromo hexavalente en agua es de 0.0 a 1.00 mgCr<sup>+6</sup>/L.

### 5.1 Método colorimétrico

El cromo hexavalente Cr (VI) se determina colorimétricamente por una reacción con 1,5 difenilcarbazida en solución ácida, la cual produce un complejo coloreado de color rojo violeta, cuya concentración de cromo se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de cromo hexavalente.

### 5.2 Interferencias.

- La reacción con la difenilcarbazida es prácticamente específica para el Cr (VI). Las sales de molibdeno hexavalente y de mercurio reaccionarán para formar color con el reactivo, pero las intensidades son mucho más bajas que para el cromo al pH especificado. Pueden tolerarse concentraciones de hasta 200 mg/L de Mo o Hg.
- El vanadio interfiere fuertemente, sin embargo en concentraciones de hasta 10 veces las del Cr (VI), no causará errores analíticos significativos.
- El hierro en concentraciones mayores a 1 mg/L, puede producir un color amarillo, pero el color de ion férrico (Fe<sup>+3</sup>) no es fuerte, y finalmente no genera interferencia si se mide la absorbancia fotométricamente a la longitud de onda apropiada.
- Las interferencias de color y turbiedad pueden contrarrestarse con el análisis de un blanco de muestra. Este debe prepararse igual que la muestra pero sin adicionar la 1,5 difenilcarbazida, la absorbancia del blanco de muestra se resta a la absorbancia de la muestra.

### 5.3 Muestreo, preservación y almacenamiento.

Tomar como mínimo 250 mL de muestra en frascos de vidrio o plástico. La recolección de la muestra debe ser puntual. Ajustar el pH de la muestra a 9.3 a 9.7 con 3 mL de buffer sulfato de amonio y 1.8 mL de NaOH 5N. Refrigerar. Cr VI disuelto. Filtrar las muestras por 0.45 µm y Cr IV Total, No filtrar.

**Nota 1:** algunas muestras pueden requerir más NaOH (5 N o 1N) para llevar a pH 9. Nunca diluya el volumen de la muestra en más del 10%.

Almacenar las muestras preservadas por un periodo máximo de 28 días. Adicionalmente para la recepción, manejo y disposición final de las muestras, debe consultarse el instructivo del laboratorio "Manejo de muestras y disposición final de residuos".

### 5.4 Materiales, Equipos y Reactivos

#### 5.4.1 Materiales.

- Balones aforados de 1000, 100 y 50 mL
- Vasos precipitados de 150 mL
- Pipetas Volumétricas de 1 mL, 10 mL
- Papel filtro de 0.45 µm

- Unidad de filtración
- Agitadores magnéticos

#### 5.4.2 Equipos.

- Espectrofotómetro disponible para utilizarse de 530 nm a 540 nm y equipado con celdas de 1 cm de paso óptico de luz.
- Balanza analítica.
- pHmetro.
- Bomba de vacío.

#### 5.4.3 Reactivos.

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo analítico, a menos que se indique otro grado.

#### • Soluciones Curva de Calibración:

- **Solución madre de cromo de 500 mg/L:** pesar aproximadamente y con precisión 141.4 mg de dicromato de potasio CERTIPUR, disolver con agua destilada y/o tipo II, aforar a 100 mL. 1 mL de esta solución es equivalente a 500 µg de Cr (VI).
- **Solución estándar de Cr (VI) de 5.0 mg/L:** Tomar 1 mL de la solución madre de cromo VI de 500 mg/L y aforar a 100 mL con agua destilada y/o tipo II. 1 mL de esta solución equivale a 5.0 µg de Cr (VI).

**Nota 2:** el cromo hexavalente es tóxico y se sospecha que es cancerígeno. Manipule con cuidado.

#### • Solución Blanco Fortificado:

- **Solución de referencia Blanco Fortificado, de 0.50 mg Cr<sup>+6</sup>/L:** preparar por dilución a partir de la solución estándar de 5.0 mg Cr<sup>+6</sup>/L. Tomar 10 mL de la solución estándar de 5.0 mg/L y aforar a 100 mL con agua destilada y/o tipo II. 1 mL de esta solución equivale a 0.50 µg de Cr (VI).
- **Solución de difenilcarbazida de 5.0 mg/mL:** pesar aproximadamente y con precisión 250 mg de difenilcarbazida y disolver en 50 mL de acetona. Almacenar en un frasco de color ámbar con contra-tapa; esta disolución es transparente al momento de prepararla, después toma un color amarillo claro. Preparar semanalmente. Descartar la disolución cuando comience a decolorarse, debe conservarse refrigerada.
- **Solución Buffer:** disolver 33 g de sulfato de amonio en 75 mL de agua. Adicionar 6.5 mL de hidróxido de amonio y aforar a 100 mL con agua tipo II y/o destilada.
- **Ácido sulfúrico 0.2 N:** agregar 5.6 mL de ácido sulfúrico concentrado a un balón que contenga 500 mL de agua destilada y/o tipo II, mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente diluir con agua destilada y/o tipo II a 1 L.
- **Hidróxido de sodio 5 N:** disolver 20 g de NaOH en 100 mL de agua tipo II y/o destilada. Almacenar en recipiente plástico.
- **Hidróxido de sodio 1 N:** disolver 4.0 g de NaOH en 100 mL de agua tipo II y/o destilada. Almacenar en recipiente plástico.
- **Ácido fosfórico concentrado (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)**
- **Ácido clorhídrico concentrado (HCl)**
- **Ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>)**
- **Agua destilada y/o tipo II filtrada por membrana de 0.45 µm**
- **Acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)**
- **Dicromato de potasio CERTIPUR**
- **Dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)**
- **Difenilcarbazida (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O)**

#### 6. Contenido.

A continuación se presentan las actividades para desarrollar el análisis de cromo hexavalente en la matriz de agua.

### 6.1 Preparación de la curva de calibración

- A partir de la solución estándar de 5.0 mg/L de Cr (VI), preparar 100 mL de cada solución para la curva de calibración aforar al volumen con agua micro filtrada, Ver tabla N° 1.

**Tabla 1 Soluciones curva de calibración**

Concentración en mg Cr <sup>6+</sup> /L	Volumen (mL) de Solución de 5.0 mg Cr <sup>6+</sup> /L
0.00	0.0
0.040	0.8
0.10	2.0
0.25	5.0
0.50	10
0.75	15
1.25	25

- Adicionar a cada solución 0.25 mL (5 gotas) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado y ajustar el pH a 2.0 utilizando solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2N.
- Adicionar 2 mL de solución de difenilcarbazida, mezclar y esperar 5 a 10 minutos para que el color se desarrolle completamente.
- Medir la absorbancia de cada solución usando un espectrofotómetro a 540 nm, usando una celda de absorción de 1 cm.
- Construir una curva de calibración, graficando la absorbancia leída contra los mg/L de Cr (VI).

**Nota 4:** Se debe graficar la curva de calibración realizando la corrección de las concentraciones de las soluciones a un volumen final de 102 mL. Aceptar un coeficiente de correlación de la curva de calibración  $\geq 0.995$ .

### 6.2 Tratamiento de la muestra, desarrollo del color y medición

- Llevar las muestras a temperatura ambiente antes del análisis.
- Filtrar las muestras a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m (Usar una porción de muestra para purgar la unidad de filtración y el filtro, a continuación, recoger el volumen requerido de filtrado).
- Tomar alrededor de 100 mL de muestra en un vaso de precipitado.
- Adicionar 0.25 mL (5 gotas) de H<sub>3</sub>P<sub>0</sub><sub>4</sub> concentrado y ajustar el pH de la muestra a 2.0  $\pm$  0.5 utilizando solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2N.
- Transferir 100 mL de la muestra ajustada a pH 2.0 a un balón volumétrico de 100 mL,
- Adicionar 2 mL de solución de difenilcarbazida, mezclar y esperar 5 a 10 minutos para que el color se desarrolle completamente.
- Si la concentración de Cr<sup>6+</sup> es mayor al rango de la curva, realizar diluciones usando agua destilada y/o tipo II filtrada por membrana de 0.45  $\mu$ m, y mezclar.
- Realizar la lectura de las muestras en la curva de calibración a 540 nm usando la celda de absorción de 1 cm.
- Realizar el cero con agua destilada y/ tipo II filtrada por membrana de 0.45  $\mu$ m.

**Nota 5:** si la muestra presenta turbidez después de diluir a 100 mL, tomar una lectura de absorbancia antes de adicionar el reactivo de difenilcarbazida y corregir la lectura de absorbancia de la solución coloreada final, restando la medición de absorbancia realizada previamente.

Si la muestra presenta color filtramos nuevamente después de ajustar pH 2.0.

### 6.3 Cálculos

Por medio de la curva de calibración, determinar la concentración de cromo hexavalente en las muestras como

*Al imprimir este documento se convierte en copia no controlada del SIG y su uso es responsabilidad directa del usuario*

 <b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA</b>		
	<b>INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR CROMO HEXAVALENTE EN AGUAS</b>		
	<b>Código:</b> IN-GAA-106	<b>Versión:</b> 04	<b>Fecha de aprobación:</b> 10/10/2022

mg/L de Cr <sup>+6</sup>.

$$\text{mg Cr}^{+6}/\text{L} = \frac{\text{C Cr}_{(VI)} \times 102 \text{ mL} * \text{FD}}{\text{A}}$$

Dónde:

**C Cr<sub>(VI)</sub>** = Concentración de cromo hexavalente en miligramos /L obtenida en la curva

**A** = Volumen original de muestra en mililitros.

**102** = Volumen final de muestra con reactivos en mililitros.

**FD**= Factor de dilución

**Nota 6:** para el reporte de datos se debe tener en cuenta el factor de dilución en el tratamiento de la muestra, si es el caso.

#### 6.4 Control de calidad

Para garantizar la calidad de los resultados emitidos, los controles de calidad establecidos para el método de ensayo son los siguientes:

- **Blanco de reactivos (blanco del método):** analizar en cada set de 20 muestras (o menos) un blanco de agua destilada tipo II, el cual debe tener todos los reactivos que normalmente están en contacto con la muestra durante todo el procedimiento analítico.
- **Blanco Fortificado:** analizar una solución de referencia de concentración conocida, en cada set de 20 muestras (o menos) cuyo valor corresponda al punto medio de la curva de calibración (o menos), preparada de la misma fuente de referencia usada para la curva de calibración, y procesarla con todos los pasos de preparación y análisis de las muestras, con la finalidad de evaluar el rendimiento del método y la recuperación del analito en la matriz blanco.
- **Matriz fortificada y duplicado de matriz fortificada:** fortificar una muestra de agua superficial, subterránea o residual (doméstica o industrial) con una cantidad conocida de nitritos (el mismo valor del blanco fortificado), con la finalidad de evaluar la recuperación del analito en una muestra real y separar el efecto matriz del desempeño del laboratorio. El duplicado se prepara de una segunda porción de muestra. Incluir una muestra fortificada y su duplicado en el lote de muestras a analizar en la semana. Evaluar los resultados como porcentaje de recuperación; el duplicado de la matriz fortificada evalúa la precisión y exactitud del método.
- **Verificación de la MCC:** con cada lote de muestras analizar una muestra preparada con la concentración del mínimo nivel de reporte (MRL). El criterio de aceptación del MRL es del 50% de error.
- **Verificación continua de la Calibración CCV:** analizar un patrón de la curva con cada lote de muestras. Las concentraciones del patrón se rotan con cada lote para cubrir los diferentes rangos de la curva de calibración.

Registrar los datos obtenidos en la bitácora del análisis. Evaluar estos controles según lo estipulado en el instructivo "Aseguramiento de la calidad de los resultados".

##### 6.4.1 Incertidumbre

La estimación de la incertidumbre para el análisis de Cromo Hexavalente en aguas- Método colorimétrico fue desarrollada de acuerdo al instructivo general "Estimación de incertidumbre".

##### 6.4.2 Reporte de resultados

Una vez realizados los cálculos y la revisión, para asegurar la calidad y confidencialidad de los mismos, el valor obtenido debe ser reportado teniendo en cuenta el instructivo general "Manejo de cifras significativas".

Si durante la ejecución del análisis se presenta una situación anómala y/o se tiene información relevante que facilita la interpretación del resultado, se debe realizar la nota aclaratoria en el sistema y en la Bitácora del análisis.

**7. Flujograma.**

No aplica

**8. Documentos de Referencia:**

- > Bitácora de análisis
- > Bitácora de los equipos (Balanza, pHmetro, Espectrofotómetro)
- > Carta de control (Hoja de Excel - Equipo reporte de resultados)

**9. Historial de Cambios:**

<b>Versión</b>	<b>Fecha</b>	<b>Cambios</b>	<b>Elaboró / Modificó</b>	<b>Revisó</b>	<b>Aprobó</b>
01	22/02/2019	Documento Nuevo	Marcela Jaramillo <i>Analista de lab.</i>		Marco A. Torres <i>Director ICAOC</i>
02	13/03/2019	Modificación en la estructura y redacción del documento.	Marcela Jaramillo <i>Analista de lab.</i>	Karen Mendoza <i>Responsable unidad</i>	Mario Gutiérrez <i>Prof. de Calidad</i>
03	03/08/2022	Ajuste de la nomenclatura y del alcance.	Jairo Novoa <i>Analista de lab.</i>	Karen Mendoza <i>Prof. Calidad CCA</i>	Juan Manuel Trujillo <i>Director CCA</i>
04	10/10/2022	Ajuste de la nomenclatura y del alcance, se agregaron 2 nuevas definiciones que fueron MCC y MRL.	Jairo Novoa <i>Analista de lab.</i>	Karen Mendoza <i>Prof. Calidad CCA</i>	Juan Manuel Trujillo <i>Director CCA</i>