

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FENOLES EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-107	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 1 de 7

1. Objetivo

Determinar el contenido de fenoles en una muestra de agua para establecer su grado de contaminación, según la norma SM 5530 A, B y D (Método fotométrico directo).

2. Alcance

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

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 fenoles 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.

- Analito:** especie química que se analiza.
- Blanco:** agua reactivo o matriz equivalente que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos disolventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra problema
- Blanco fortificado:** es una herramienta estadística que garantiza la calidad de los resultados, y permite llevar un control sobre las pruebas y a su vez sobre los equipos.
- Calibración:** proceso mediante el cual se establece la relación entre la indicación de un instrumento o sistema y el valor establecido para un patrón de medición.
- Material de referencia certificado:** material de referencia, acompañado de un certificado, en el que una o más de sus propiedades está certificada por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresa dicha propiedad, y para el que cada valor certificado está asociado a una incertidumbre con un nivel de confianza determinado.
- Muestra:** parte representativa de la materia objeto del análisis.
- Patrón:** medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud para servir de referencia.
- 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 al analito en las muestras.
- SM:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

5. Condiciones Generales.

Los fenoles se definen como hidroxiderivados del benceno y sus núcleos condensados, pueden encontrarse en aguas residuales domésticas e industriales. La cloración de estas aguas puede producir aguas con olores desagradables debido a la formación de clorofenoles.

El método colorimétrico de la 4-Aminoantipirina determina fenoles Orto y Meta sustituidos, y bajo condiciones apropiadas de pH permite determinar fenoles p-sustituidos en los cuales el sustituyente puede ser un grupo Carboxil, Halógeno, Metoxil o Ácido Sulfónico. No se pueden determinar fenoles p-sustituidos donde el grupo sea un grupo alquil, aril, nitro, benzoil, nitroso o aldehído. Un ejemplo típico de este último grupo es el paracresol que puede estar presente en las aguas residuales industriales.

Debido a que las cantidades relativas de diferentes compuestos fenólicos son impredecibles, no es posible contar con un estándar universal que contenga una mezcla de fenoles. Por esta razón el fenol (C_6H_5OH) se ha seleccionado como estándar para los métodos colorimétricos, y cualquier color producido por la reacción de otros compuestos fenólicos es reportada como fenol. Considerando que los sustituyentes generalmente reducen la respuesta, este valor representa la mínima concentración de compuestos fenólicos.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FENOLES EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-107	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 2 de 7

5.1 Método fotométrico directo.

Los compuestos fenólicos destilables reaccionan con la 4-Aminoantipirina a pH 7.9 ± 0.1 en presencia de ferricianuro de potasio para formar un compuesto coloreado de antipirina estable en solución acuosa y su absorbancia se mide a 500 nm.

Los Fenoles se separan de las impurezas no volátiles por destilación. Debido a que la volatilización de los Fenoles es gradual, el volumen destilado debe ser igual al de la muestra original.

5.2 Interferencias.

Las interferencias tales como descomposición de fenol por bacterias, sustancias oxidantes y reductoras y valores de pH alcalinos se eliminan por acidificación de la muestra. Algunas aguas de desecho muy contaminadas pueden requerir técnicas especializadas para eliminar interferencias y para la recuperación cuantitativa de compuestos fenólicos.

Muchas de las interferencias se reducen al mínimo con el proceso de destilación. La muestra es destilada para remover impurezas no volátiles. Debido a que la volatilización de los fenoles es gradual, el volumen del destilado debe ser en última instancia igual al de la muestra original.

Los agentes oxidantes tales como cloro y aquellos detectados por la liberación de yodo por acidificación en presencia de yoduro de potasio (KI), se remueven inmediatamente después del muestreo adicionando un exceso de sulfato ferroso (FeSO_4). Si los agentes oxidantes no son removidos, los compuestos fenólicos pueden ser oxidados parcialmente.

Los compuestos de azufre se eliminan por acidificación a pH 4.0 con H_3PO_4 y aireando brevemente la muestra por agitación. Esto elimina la interferencia de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y dióxido de azufre (SO_2).

Los aceites y los alquitranes se eliminan haciendo una extracción alcalina ajustando el pH entre 12 y 12.5 con perlas de NaOH. Los aceites y los alquitranes se extraen de la solución acuosa con 50 mL de cloroformo (CHCl_3). Descartar la capa que contiene los aceites y los alquitranes. Eliminar el exceso de cloroformo de la capa acuosa por calentamiento en un baño de agua antes de la destilación.

5.3 Muestreo, preservación y almacenamiento.

Tomar muestras representativas siguiendo las instrucciones dadas en el SM 1060. Las muestras pueden ser recolectadas en recipiente de vidrio o plástico, y pueden ser muestras puntuales o compuestas.

Los fenoles en las concentraciones usualmente encontrados en aguas de desecho están sujetos a oxidación biológica y química. Preservar y almacenar las muestras a 4°C o menos, a menos que se analice dentro de las 4 horas posteriores a la recolección. Si esto no es posible, preservar adicionando 2 mL de H_2SO_4 concentrado por litro de muestra, o el necesario hasta obtener un pH <2 . Analizar las muestras almacenadas y preservadas dentro de los 28 días posteriores al muestreo. Antes del análisis llevar las muestras a temperatura ambiente.

5.4 Materiales, equipos y reactivos.

5.4.1 Materiales.

- > Balones aforados de 25, 100 y 1000 mL
- > Pipetas volumétricas de diferentes volúmenes
- > Vasos de precipitado de 100, 150 y 250 mL

5.4.2 Equipos.

- > Balanza analítica.
- > Equipo de destilación en vidrio.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FENOLES EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-107	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 3 de 7

- Medidor de pH con electrodos respectivos.
- Plancha de calentamiento eléctrica.
- Bureta o Dosimat.
- Espectrofotómetro para usar a 500 nm.
- Celdas de 1 cm.

5.4.3 Reactivos.

• Soluciones para la curva de Calibración:

- Solución stock de 1000 mg de Fenol/L (0.06376 N) para la curva de calibración: disolver 1 g de fenol en aproximadamente 900 mL de agua recientemente destilada y fría. Llevar la solución a un balón aforado de 1000 mL con agua destilada y/o tipo II. (**El fenol es tóxico**, se debe manejar cuidadosamente).
- Solución intermedia de Fenol de 10 mg/L (1 mL = 10 µg Fenol): diluir 10 mL de solución stock de Fenol con agua tipo II y/o destilada, y llevar a 1000 mL. Preparar diariamente.

• Soluciones para el Blanco fortificado

- Solución de referencia de 2.50 mg fenol/L, para el blanco fortificado: diluir 25 mL de la solución intermedia de 10 mg de fenol/L con agua tipo II y/o destilada a 100 mL.

• Soluciones para Estandarizar la Solución de fenol

- Solución de Bromuro - Bromato (0.100 N): disolver 0.2784 g de Bromato de Potasio (KBrO₃) Anhidro y 1.0 g de Bromuro de Potasio (KBr) en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 100 mL.
- Ácido Clorhídrico concentrado.
- Titrisol de Tiosulfato de Sodio 0.1 N, o preparar una solución 0.025 N así: Disolver 6.205 g de Na₂S₂O₃ · 5 H₂O en agua destilada. Adicionar 1.5 mL de NaOH 6N o 0.4 g de NaOH sólido y diluir a 1000 mL. Estandarizar con solución de biyodato de potasio [KH(IO₃)₂].
- Yoduro de Potasio (KI) sólido.
- Solución estándar de biyodato de potasio 0.0021M ó 0.025N): disolver 812.4 mg KH(IO₃)₂ en agua destilada y aforar a 1000 mL (peso equivalente = peso molecular/12).
- Solución de Almidón: disolver 2 g de almidón soluble y 0.2 g de Ácido Salicílico (como preservante) en 100 mL de agua destilada y/o tipo II caliente, agite evitando la formación de grumos, enfriar y almacenar la solución en un recipiente pequeño.

• Estandarización del tiosulfato de sodio:

- En un erlenmeyer colocar aproximadamente 2 g de KI (libre de yodato).
- Agregar 100 mL de agua destilada, 4 gotas de H₂SO₄ concentrado y 20 mL de Solución de KH(IO₃)₂ 0.025N, y diluir a 200 mL.
- Titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0.1N ó 0.025N, añadiendo almidón hacia el final de la titulación, o sea cuando se produzca un color paja pálido o marrón; al agregar el almidón se torna color azul, continuar con la titulación hasta incoloro.
- Hacer la estandarización por triplicado.
- Calcular la concentración de la solución de tiosulfato de sodio aplicando la siguiente fórmula:

$$Na_2S_2O_3(N) = \frac{V(KH(IO_3)_2) * N(KH(IO_3)_2)}{V Na_2S_2O_3}$$

Dónde:

N(Na₂S₂O₃) = Normalidad de la solución tiosulfato de sodio.

V(Na₂S₂O₃) = Volumen de tiosulfato de sodio empleado en la titulación, en mL.

V(KH(IO₃)₂) = Volumen de biyodato de potasio empleado en la titulación, en mL.

N(KH(IO₃)₂) = Normalidad de la solución de biyodato de potasio.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FENOLES EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-107	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 4 de 7

• **Soluciones para Destilación de las muestras**

- Ácido Fosfórico 1:9: diluir 10 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) del 85%, a 100 mL con agua tipo II y/o destilada.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 2.5 N: disolver 10 g NaOH en un vaso de precipitado, y diluir a 100 mL con agua tipo II y/o destilada.

• **Reactivos especiales para destilados turbios:**

- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N.
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Cloroformo (CHCl₃) o cloruro de metileno (CH₂Cl₂).

• **Solución para desarrollo de Color**

- Hidróxido de Amonio (NH₄OH) 0.5 N: diluir 35 mL de NH₄OH concentrado hasta 1 L con agua tipo II y/o destilada.
- Buffer de Fosfato de pH 6.8: disolver 104.5 g de Fosfato de Potasio Dibásico (K₂HPO₄) y 72.3 g de Fosfato Monobásico de Potasio (KH₂PO₄) en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 1 L. El pH debe ser de 6.8.
- Solución de 4-Aminoantipirina: disolver 2 g de 4-Aminoantipirina en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 100 mL. **Preparar diariamente.**
- Solución de Ferricianuro de Potasio: disolver 8 g de K₃Fe(CN)₆ y llevar a 100 mL con agua tipo II y/o destilada. Filtrar si es necesario y almacenar en un frasco oscuro. Preparar semanalmente.

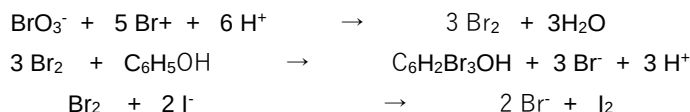
Estandarización de la solución de fenol de 1000 mg/L

- Medir 100 mL de agua tipo II y/o destilada en un frasco ámbar de 500 mL con tapa esmerilada.
- Agregar 10 mL de solución stock de fenol (1000 mg/L) y 10 mL de solución de bromuro-bromato. Inmediatamente adicionar 5 mL de HCl concentrado y mezclar cuidadosamente.

Nota 1: si el color marrón del bromo libre no persiste, agregue porciones de 10,0 ml de solución de bromuro de bromato hasta que lo haga, puede requerir cuatro porciones de 10 ml de solución de bromuro de bromato si la solución de fenol original contiene 1000 mg de fenol/L.

- Dejar en reposo 10 minutos en la oscuridad.
- Agregar aproximadamente 1 g de KI y titular con solución de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₅) 0.1 N ó 0.025M hasta que la solución tenga un color amarillo pálido.
- Seguidamente agregar 0.5 mL de la solución de almidón y continuar la titulación hasta que la solución quede incolora.
- Preparar un blanco de la misma manera usando agua tipo II y/o destilada, y 10 mL de solución de bromuro-bromato. Titular

Las reacciones químicas que ocurren son las siguientes:



Peso equivalente del fenol = Peso molecular/6.

Calcular la concentración de la solución stock de fenol como se indica en la siguiente fórmula:

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{(A - B) \times N \times 15.6833 \times 1000}{V}$$

Dónde:

C = Concentración de la solución stock, en mg fenol/L.

A = Volumen de tiosulfato de sodio empleado para titular el blanco, en mL.

B = Volumen de tiosulfato de sodio empleado para titular la solución stock, en mL.

N = Normalidad del tiosulfato de sodio.

V = Volumen tomado de la solución stock de fenol, en mL.

15.6833 = Peso miliequivalente del fenol.

6. Contenido.

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

6.1 Método fotométrico directo.

6.1.1 Curva de calibración.

- > A partir de la solución intermedia de 10 mg de fenol/L preparar 100 mL de estándares de para la curva de calibración método directo. En la Tabla 1 se indican los volúmenes a tomar y las concentraciones de los estándares. Usar agua tipo II y/o destilada para preparar los estándares.

Tabla 1. Preparación de estándares para curva de calibración Método Directo

Volumen (mL) de la solución de 10 mg de fenol/L	mg de fenol/L
0	0.00
1	0.10
3	0.30
5	0.50
10	1.00
20	2.00
30	3.00
40	4.00
50	5.00

6.1.2 Destilador de vidrio para fenoles.

Limpieza del equipo de destilación: Antes de iniciar el proceso de destilación se requiere limpiar el equipo de destilación (condensadores) siguiendo los siguientes pasos:

- > Lavar los condensadores con solución de ácido sulfúrico 0.1 N. Si se han destilado muestras muy contaminadas, usar mezcla sulfocrómica.
- > Seguidamente lavar con agua destilada caliente para retirar residuos de grasa.
- > Terminar el proceso de limpieza con agua tipo II y/o destilada.
- > Recoger las soluciones de lavado y desecharlos a los residuos ácidos.

6.1.3 Destilación de muestra.

- > Medir 100 mL de muestra y transferirla a un vaso de precipitados.
- > Ajustar el pH a aproximadamente 4.0 con solución de NaOH 2.5 N si la muestra ha sido preservada con ácido sulfúrico a pH < 2. Si la muestra no ha sido preservada con ácido, ajustar el pH a 4.0 con ácido fosfórico 1:9.
- > Transferir la muestra al aparato de destilación, purgar el vaso que contiene la muestra con 10 mL de agua tipo II y/o destilada, destilar hasta recolectar 100 mL y si es necesario aforar hasta el volumen de muestra original tomada con agua tipo II y/o destilada.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FENOLES EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-107	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 6 de 7

- Normalmente una destilación es suficiente para purificar la muestra. Si el destilado es turbio, acidificar con ácido fosfórico 1:9 y repetir la destilación siguiendo los pasos descritos anteriormente.
- Si segundo el destilado todavía está turbio, usar el proceso de extracción descrito a continuación antes de destilar la muestra.

• Tratamiento cuando el segundo destilado es turbio.

Extraer una porción de 100 ml de la muestra original de la siguiente manera:

- Agregar 4 gotas de indicador de naranja de metilo y acidificar con H_2SO_4 1N.
- Transferir a un embudo de decantación y agregar 30 g de NaCl.
- Agitar con cinco porciones sucesivas de CHCl_3 , usando 8 mL en la primera porción y 5 mL en cada porción sucesiva.
- Transferir la capa de CHCl_3 a un segundo embudo de decantación y agitar con tres porciones sucesivas de solución de NaOH 2.5N, usando 1.0 mL en la primera porción y 0.50 mL en cada una de las siguientes dos porciones.
- Combine los extractos alcalinos, caliente en un baño de agua hasta que se haya eliminado CHCl_3 , enfriar y diluir a 100 mL con agua destilada.
- Proceder con la destilación como se indica.

Nota 2: puede usarse CH_2Cl_2 en lugar de CHCl_3 , especialmente si se forma una emulsión cuando la solución de CHCl_3 se extrae con NaOH.

6.1.4 Lectura de los estándares y de las muestras.

- Colocar los 100 mL del blanco y los estándares en vasos de 150 mL.
- Adicionar 2.5 mL de NH_4OH 0.5 N e inmediatamente ajustar el pH a 7.9 ± 0.1 con buffer de fosfatos.
- Agregar 1.0 mL de solución de 4-Aminoantipirina y mezclar bien.
- Adicionar 1.0 mL de solución de ferricianuro de potasio y agitar bien.
- Después de 15 minutos transferir a las celdas de 1 cm y leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 500 nm.
- Construir una curva de calibración, aceptar un coeficiente de correlación ≥ 0.995 .
- Para la lectura de las muestras seguir el mismo procedimiento descrito para los estándares.

Nota 3: Los volúmenes de las soluciones pueden cambiar, en este caso la cantidad de reactivo usado para prepararlos debe ser proporcional al volumen de solución.

6.1.5 Cálculos.

La concentración de fenoles en la muestra se lee en la curva de calibración como mg Fenol/L.

6.2 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, 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 o una diferente, y procesarla con todos los pasos de preparación y análisis de las muestras, con la finalidad es evaluar el rendimiento del método y la recuperación del analito en la matriz blanco.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FENOLES EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-107	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 7 de 7

Matriz fortificada y duplicado de matriz fortificada: fortificar una muestra de agua superficial, subterránea o residual (doméstica o industrial) con una cantidad conocida del analito (la misma concentración con la que se prepara el 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. Como mínimo, Incluir una muestra fortificada y su duplicado con cada lote de muestras a analizar. Evaluar los resultados como porcentaje de recuperación; el duplicado evalúa la precisión y exactitud.

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 $\pm 50\%$ 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 validez de los resultados".

6.2.1 Incertidumbre.

La estimación de la incertidumbre para el análisis de fenoles método fotométrico fue desarrollada de acuerdo al instructivo general "Estimación de incertidumbre".

6.2.2 Reporte de resultados

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

7. Flujograma

No aplica

8. Documentos de Referencia

- Bitácora del análisis
- Bitácora de manejo de equipos
- Carta de control

9. Historial de Cambios

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	22/02/2019	Documento Nuevo	Marlene Estrada. <i>Líder Químico.</i>		Marco A. Torres <i>Director ICAOC</i>
02	13/03/2019	Correcciones estructurales y de redacción.	Marlene Estrada. <i>Líder Químico.</i>	Karen Mendoza <i>Responsable unidad</i>	Mario Gutiérrez <i>Prof. de Calidad</i>
03	03/08/2022	Se ajustó la nomenclatura del blanco fortificado y del alcance	Juan Arévalo <i>Analista lab.</i>	Karen Mendoza <i>Prof. Calidad CCA</i>	Juan Manuel Trujillo <i>Director CCA</i>