

## 1. Objetivo.

Determinar el contenido de fósforo total según la norma SM 4500-P B, E y fósforo reactivo disuelto en soluciones acuosas; según la norma SM 4500-P E, asegurando la entrega oportuna de resultados confiables a nuestros clientes y su satisfacción en la prestación del servicio.

## 2. Alcance.

Este instructivo aplica para el análisis de aguas residuales no domésticas, aguas residuales domésticas, aguas subterráneas, 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 fósforo total y soluble 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.
- 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.
- Blanco fortificado:** trazos gráficos 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.
- Fósforo disuelto:** corresponde al fósforo que pasa a través de una membrana de filtración de 0.45µm., y a un test colorimétrico, sin haber sometido la muestra a hidrólisis o digestión ácida.
- Fósforo hidrolizable por ácido:** partículas de Fósforo condensado y disuelto que son convertidas a Ortofosfato disuelto por Digestión Ácida en caliente.
- Fósforo orgánico o enlazado orgánicamente:** fracción de Fosfatos que son convertidos a Ortofosfatos por la destrucción de la materia orgánica.
- Fósforo reactivo:** fósforo que corresponde a test colorimétrico, sin haber sometido la muestra a Hidrólisis o Digestión Ácida.
- Fósforo suspendido:** corresponde al Fósforo que queda retenido en la membrana.
- Fósforo total:** es la concentración de Fósforo determinada en una muestra sin filtrar después de someterla a digestión ácida.
- 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.
- NIST:** Instituto Nacional para Estándares y Tecnología.
- 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.
- 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 al analito en las muestras.

 <b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA</b>			
	<b>INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FÓSFORO TOTAL Y FÓSFORO REACTIVO DISUELTOS EN AGUAS</b>			
	<b>Código:</b> IN-GAA-108	<b>Versión:</b> 03	<b>Fecha de aprobación:</b> 03/08/2022	<b>Página:</b> 2 de 6

## 5. Condiciones Generales.

El fósforo se encuentra en aguas naturales y de desecho en su mayoría como fosfatos; estos se clasifican como ortofosfatos, fosfatos condensados (piro, meta y otros polifosfatos) y fosfatos unidos orgánicamente. Se encuentran en solución, en las partículas o detritos, o en los cuerpos de los organismos acuáticos.

El fósforo es ampliamente distribuido en el ambiente como fosfatos enlazados orgánicamente e inorgánicamente, las fuentes de los fosfatos incluyen superficies donde se utilizan fertilizantes, productos de limpieza, lavandería, acondicionadores de agua caliente y tratamientos de agua para consumo. Debido a que el Fósforo es un nutriente que limita la productividad primaria de un cuerpo de agua, es muy importante monitorear y controlar su descarga en el ambiente.

### 5.1 Método del ácido ascórbico

El molibdato amónico y el tartrato antimónico potasio, reaccionan en medio ácido con ortofosfatos para formar un ácido heteropoliácido fosfomolibdico que se reduce a azul de molibdeno, de color intenso por el ácido ascórbico. Este método es adecuado para concentraciones de 0.01 a 6.0 mg P/L.

### 5.2 Interferencias.

- Los arseniatos reaccionan con el reactivo de molibdato y producen un color azul similar al que se forma con el fosfato. Concentraciones de arseniato tan bajas como 0.1 mg As/L interfieren en la determinación de fosfato.
- El cromo hexavalente y los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) interfieren con la determinación de fósforo, y dan resultados un 3% más bajos a concentraciones de 1.0 mg/L, y del 10 al 15% más bajos a concentraciones de 10 mg/L.
- El sulfuro ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) y el silicato no interfieren a concentraciones de 1.0 y 10 mg/L.

### 5.3 Muestreo, preservación y almacenamiento.

- Tomar muestras representativas siguiendo las instrucciones dadas en el SM 1060, en recipientes limpios de vidrio oscuro. Muestras con bajo contenido de fósforo pueden ser almacenadas en recipientes de plástico solo si estas son congeladas, ya que los fosfatos son adsorbidos por el plástico.
- Análisis de fósforo total: Agregar 1mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a pH <2.0 y refrigerar, o congelar sin agregar ningún reactivo y analizar durante los 28 días siguientes a la recolección de la muestra.
- Análisis de fósforo reactivo disuelto: filtrar las muestras por membrana de filtración de 0.45  $\mu\text{m}$  inmediatamente se recolectan, verificar que las muestras tengan pH < 8.3, si tienen pH  $\geq$  8.3 adicionar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N hasta ajustar el pH de la muestra y analizar el filtrado antes de 48 horas.
- Almacenar en recipientes de vidrio y refrigerar. Si las muestras se van a almacenar por periodos largos de tiempo, adicionar 40 mg de  $\text{HgCl}_2/\text{L}$  a cada muestra. **Precaución:** el  $\text{HgCl}_2$  es una sustancia peligrosa, se deben tomar las medidas adecuadas.
- El material a usar en la recolección de la muestra se debe lavar siguiendo el instructivo del laboratorio "Lavado de material".

## 5.4 Materiales, Equipos y Reactivos

### 5.4.1 Materiales.

- Material de vidrio lavado con una solución de HCl (1:1) y jabón extrán exento de fosfatos.
- Balones volumétricos de diferentes volúmenes.
- Vasos de precipitado de diferentes volúmenes.
- Pipetas Volumétricas de diferentes volúmenes
- Vidrio de reloj.
- Membranas filtrantes de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.2 Equipos.

- Balanza Analítica.
- Espectrofotómetro para usar a 880 nm.
- Celdas de 1 cm de paso de luz.
- Plancha de calentamiento.
- Bomba de vacío.
- Equipo de filtración al vacío.

#### 5.4.3 Reactivos.

- **Agua tipo II y/o destilada.**
- **Ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N:** diluir 70 mL de ácido sulfúrico concentrado a 500 mL con agua destilada y/o tipo II.
- **Solución de tartrato antimónico de potasio:** disolver 1.3715 g de K<sub>2</sub>(SbO)<sub>2</sub>C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>10</sub>\*3H<sub>2</sub>O en 400 mL de agua destilada y/o tipo, II en un balón aforado de 500 mL y diluir hasta el aforo.
- **Solución de molibdato amónico:** disolver 20 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O en 500 mL de agua destilada y/o tipo II.
- **Ácido ascórbico 0.1M:** disolver 1.76 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada y/o tipo II. La solución es estable durante una semana, aproximadamente a 4°C.
- **Reactivo combinado:** mezclar los reactivos anteriores en las siguientes proporciones para 100 mL de reactivo combinado: 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N, 5 mL de solución de tartrato antimónico de potasio, 15 mL de solución de molibdato amónico y 30 mL de solución de ácido ascórbico. Mezclar después de la adición de cada reactivo.

**Nota 1:** Dejar que cada reactivo alcance la temperatura ambiente antes de mezclar y luego hacer la mezcla en el orden citado. Si se forma turbidez en el reactivo combinado, agitar y dejar reposar unos minutos hasta que desaparezca, antes de continuar. El reactivo es estable durante 4 horas.

- **Hidróxido de sodio 1 N.** Pesar 10 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 mL con agua tipo II y/o destilada, transferir a un balón aforado de 250 mL y diluir hasta el aforo.
- **Hidróxido de sodio 2.5 N.** Pesar 50 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 mL con agua tipo II y/o destilada, transferir a un balón aforado de 500 mL y diluir hasta el aforo.
- **Solución alcohólica de fenolftaleína al 1 %.** Pesar 0.5g de fenolftaleína en 50 mL de alcohol etílico.

#### ● Soluciones para Curva de Calibración:

- **Solución estándar** Certipur de 1000 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L (326.1 mg P/L)
  - **Solución estándar** de 100 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L (32.61 mg P/L). Preparar a partir de la solución Certipur de 1000 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L. Tomar 10 mL de la solución de 1000 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L y diluir a 100 mL con agua tipo II y/o destilada.
  - **Solución estándar** de fosfatos de 10 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L (3.261 mg P/L). Tomar 10 mL de la solución de 100 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L y diluir a 100 mL con agua tipo II y/o destilada.
- **Soluciones para blanco fortificado de 0.39 mg P/L:** tomar 6 mL de la solución estándar de 10 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L y lleve a volumen en un balón de 50 mL con agua tipo II y/o destilada.

**Nota 2:** Los volúmenes de las soluciones pueden cambiar, en este caso la cantidad de reactivo usado para prepararlos debe ser proporcional al volumen.

## 6. Contenido.

A continuación, se presentan las actividades para desarrollar el análisis de fósforo total y reactivo disueltos en matrices acuosas.

## 6.1 Determinación de la concentración de fósforo total.

### 6.1.1 Preparación de la curva de calibración.

A partir de una solución de 10 mg PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/L (3.261 mgP/L), preparar **50 mL** de cada solución para la curva calibración, aforar al volumen con agua tipo II y/o destilada (ver tabla N° 1).

**Tabla 1. Curva de calibración de fósforo**

Volumen (mL) de Solución de 10 mg PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> /L (3.261 mg P/L)	Concentración (mg P/L)
0.0	0.000
1.5	0.098
3.0	0.196
5.0	0.326
7.0	0.457
10.0	0.652
12.0	0.783

Para realizar el análisis de fósforo total seguir el procedimiento anterior y adicionalmente realizar la digestión a cada una de las soluciones de referencia según procedimiento dado en la sección 6.1.2.

### 6.1.2 Digestión con ácido nítrico y ácido sulfúrico.

- > Medir en vasos de precipitado de 100 o 150 mL, 50 mL de las soluciones de la curva de calibración, 50 mL de las muestras a analizar, 50 mL de solución de referencia del blanco fortificado (0.39 mg P/L) y 50 mL de agua tipo II y/o destilada para el blanco. Agregar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 mL de ácido nítrico concentrado a cada vaso, y tapar con vidrio de reloj.
- > Calentar las soluciones en una plancha alrededor de 100°C hasta reducir el volumen a 1 mL, y continuar el calentamiento hasta que se obtenga una solución incolora para eliminar el ácido nítrico, o hasta que se desprendan vapores blancos de SO<sub>3</sub>.

**Nota 4.** La posición de la perilla se debe colocar de acuerdo a la información de temperatura dada en la plancha a utilizar en la digestión. Confirmar la temperatura de la plancha colocando un vaso de precipitado con agua destilada y usando un termómetro de vidrio.

- > Enfriar y agregar aproximadamente 20 mL de agua tipo II y/o destilada.
- > Adicionar una gota de fenoltaleína y poner en agitación.
- > Neutralizar con solución de hidróxido de sodio 2.5 N hasta obtener una coloración rosa.
- > Adicionar gota a gota H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N hasta que desaparezca el color.
- > Transferir cada solución resultante a balones de 50 mL, y completar el volumen con agua tipo II y/o destilada.

**Nota 5:** si es necesario, filtrar la solución neutralizada para remover turbiedad.

### 6.1.3 Desarrollo de color.

- > Trasvasar a vasos de precipitado de 100 mL los 50 mL de las soluciones de referencia previamente digestada.
- > Agregar 8 mL de reactivo combinado y homogenizar.
- > Después de 10 min, pero antes de 30 min, elaborar una curva de calibración leyendo la absorbancia de las soluciones a 880 nm empleando una celda de 1 cm, utilizando el blanco de reactivos como solución de referencia.
- > Aceptar un coeficiente de correlación de la curva de calibración ≥ 0.995.
- > En el espectrofotómetro se debe revisar el paso de luz de la celda usada en la determinación.

 <b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA</b>			
	<b>INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FÓSFORO TOTAL Y FÓSFORO REACTIVO DISUELTOS EN AGUAS</b>			
	<b>Código:</b> IN-GAA-108	<b>Versión:</b> 03	<b>Fecha de aprobación:</b> 03/08/2022	<b>Página:</b> 5 de 6

Para las muestras, una vez realizada la digestión proceder al desarrollo de color como se indica en la sección 6.1.3. Si la concentración de fósforo en la muestra es mayor a 0.78 mgP/L, hacer las diluciones correspondientes antes de la digestión.

**Nota 6:** Los volúmenes de las soluciones pueden cambiar, en este caso la cantidad de reactivo usado para prepararlos debe ser proporcional al volumen de la solución.

- **Corrección de la turbidez o color interferente:**

- El color natural del agua no suele interferir a la elevada longitud de onda empleada. Para aguas turbias o muy coloridas, pasar la muestra mediante un filtro whatman 41 y diluir hasta un volumen de 50 mL con agua destilada o tipo II.

Calcular la concentración de fósforo total o reactivo disuelto de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{mg P/L} = \text{LC} * \text{FD}$$

Dónde:

LC= mg P/L de la muestra interpolado en la curva de calibración

FD= Factor de dilución

## 6.2 Determinación de fósforo reactivo disuelto.

Para la determinación de fósforo reactivo disuelto, preparar curvas de calibración siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 6.1.1 y 6.1.3, pero sin realizar digestión con ácido nítrico y sulfúrico a los estándares y a las muestras.

Para la determinación de fósforo reactivo disuelto, filtrar las muestras por membrana de 0.45 µm, verificar que las muestras tengan pH < 8.3. Si tienen pH ≥ 8.3 adicionar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N hasta ajustar el pH de la muestra y analizar el filtrado antes de 48 horas.

## 6.3 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.

**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 ± 50% de error.

 <b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA</b>			
	<b>INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR FÓSFORO TOTAL Y FÓSFORO REACTIVO DISUELTOS EN AGUAS</b>			
	<b>Código:</b> IN-GAA-108	<b>Versión:</b> 03	<b>Fecha de aprobación:</b> 03/08/2022	<b>Página:</b> 6 de 6

**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".

#### 6.1.4 Incertidumbre

La estimación de la incertidumbre para el análisis de fósforo total y fósforo reactivo disuelto en aguas fue desarrollada de acuerdo al instructivo general "Estimación de incertidumbre".

#### 6.1.5 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 facilite 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 del análisis
- > Bitácora de equipos
- > Carta de control
- > Formato de equipos

### 9. Historial de Cambios

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	22/02/2019	Documento Nuevo	Melitza Agamez. <i>Analista de lab.</i>		Marco A. Torres <i>Director ICAOC</i>
02	13/03/2019	Correcciones estructurales y de redacción.	Melitza Agamez. <i>Analista de lab.</i>	Karen Mendoza <i>Responsable unidad</i>	Mario Gutiérrez <i>Prof. de Calidad</i>
03	03/08/2022	Correcciones en los alcances y nomenclatura del blanco fortificado.	Jairo Novoa <i>Analista de lab.</i>	Karen Mendoza <i>Prof. Calidad CCA</i>	Juan Manuel Trujillo <i>Director CCA</i>