

Determinación de Fosfatos en Aguas por Método Colorimétrico. Validación del Método

Carlos Severiche-Sierra^{1*} y Humberto Gonzalez-Garcia¹

¹Aguas de Cartagena SA ESP, Laboratorio de Calidad de Aguas, Planta de Tratamiento de Agua Potable el Bosque, Cartagena, Colombia.

*E-mail: cseveriches@gmail.com.

Recibido 29 de mayo de 2012, Aceptado 19 de junio de 2012

Resumen

Una de las metas de un análisis químico es generar resultados correctos y confiables, en el presente estudio, se hizo la validación de las determinaciones de fosfatos en muestras de agua por el método colorimétrico del ácido ascórbico, el objetivo de este trabajo fue confirmar que el laboratorio aplica correctamente el método normalizado y modificado, para el análisis de agua, que genera resultados confiables y verificables, en esta investigación, se trabajaron matrices de tipo agua potable, agua superficial, y agua industrial, siguiéndose estrictamente los protocolos de validación, donde se encontraron resultados satisfactorios en precisión y exactitud.

Palabras clave: fosfato, agua, validación, método analítico.

1. Introducción

La concentración de fosfatos en los cuerpos agua superficiales representa un problema debido a la reproducción geométrica de los organismos unicelulares que dependen del fósforo como fuente de alimentación [1]. En las aguas naturales y residuales, el fósforo se presenta mayoritariamente en forma de fosfatos. Estos son clasificados en ortofosfatos, fosfatos condensados (piro, meta y otros polifosfatos) y fosfatos enlazados orgánicamente. Se encuentran en solución, en partículas o detritus o en cuerpos de organismos acuáticos y pueden provenir de diversas fuentes [2]. Entre las fuentes de fósforo de origen natural cabe mencionar los depósitos y rocas fosfóricas las cuales desprenden fósforo, en forma de ortofosfatos principalmente, mediante erosión. Las fuentes antropogénicas puntuales incluyen las aguas servidas domésticas e industriales; las fuentes no puntuales están asociadas con la escorrentía de áreas agrícolas y domésticas [3,4].

Los organismos dependen del fósforo ya que es esencial para el crecimiento y puede ser el nutriente limitador del crecimiento, la descarga de aguas residuales brutas o tratadas, drenados agrícolas o ciertos residuos industriales a ese cuerpo de agua, puede estimular el crecimiento de micro y macrorganismos acuáticos fotosintéticos en grandes cantidades, lo cual puede alterar el balance de la vida en este medio [2]. El fósforo es considerado como un parámetro crítico en la calidad del agua debido a su influencia en el proceso de eutrofización, de ahí la importancia de disponer de técnicas analíticas y de muestreo adecuadas para la determinación de la concentración de las diferentes especies que pueden estar disueltas en el agua, adsorbidas sobre partículas o asociadas con organismos acuáticos [5].

Una fracción del P presente en los fertilizantes orgánicos e inorgánicos es adsorbida por las plantas, otra fracción es arrastrada por el agua y el resto se

acumula en el suelo y sedimentos, lo cual trae como consecuencia la presencia de cantidades elevadas de este elemento en ríos y lagos. Las lluvias también contribuyen con una cantidad importante del fósforo total presente en las aguas superficiales [3-5]. La concentración de P en agua de lluvia varía con el tiempo y el espacio, reportando concentraciones más altas en zonas industriales y agrícolas durante la estación de verano [4].

El aumento en la demanda de agua potable se debe al crecimiento demográfico mundial, al rápido desarrollo económico y social, a la urbanización acelerada, y a las mejoras en el nivel de vida y los ecosistemas circundantes [6,7]. El control de la calidad del agua es muy importante, ya que esta es el medio de transporte de microorganismos y elementos químicos que puedan impactar la salud y el ambiente [8]. Para llevar a cabo la inspección, vigilancia y control es necesario realizar un seguimiento de las características físicoquímicas y microbiológicas del proceso de potabilización de agua y del producto terminado, con el fin de comparar con los valores normativos [9,10].

El análisis químico de fósforo implica dos etapas básicas, la conversión de la forma de fósforo que interesa determinar, a ortofosfato disuelto. Esto se logra mediante una hidrólisis o digestión oxidante con ácido sulfúrico. Cuando se quiere distinguir entre la forma disuelta y la suspendida, se realiza una filtración por membrana, y la determinación colorimétrica de ortofosfatos. De los tres métodos existentes: ácido vanadomolibdofosfórico, cloruro de estaño (II) y ácido ascórbico, se ha seleccionado este último por su sensibilidad y simplicidad. En este método, en medio ácido el molibdato de amonio y el tartrato doble de antimonio y potasio reaccionan con ortofosfato con formación de un heteropoliácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdeno, complejo azul

intensamente coloreado. La absorbancia del complejo medida a una longitud de onda de 880 nm, resulta proporcional a la concentración de ortofosfatos en la muestra. Los fosfatos que responden a la determinación colorimétrica sin recurrir a la etapa 1, se consideran “fósforo reactivo”, el cual da una medida fundamentalmente del ortofosfato, sin excluir una pequeña fracción de fosfato condensado que puede hidrolizarse durante el análisis [11].

El método es aplicable a todo tipo de aguas, incluyendo las marinas, ya que la influencia de la salinidad es despreciable en la intensidad del color. El color natural del agua no suele interferir a la elevada longitud de onda empleada. Con aguas turbias o muy coloreadas, preparar un blanco sin adición de reactivo combinado y restar su absorbancia a la de la muestra. Diversas sustancias como arsenatos, cromo hexavalente y nitritos, pueden causar interferencias, aunque las concentraciones necesarias para que esto ocurra, habitualmente no son encontradas.

A nivel mundial no se tiene establecido un valor admisible para fosfatos en aguas, pero el departamento de desarrollo rural, medio ambiente y administración local de Navarra, España, en vista del peligro potencial para las aguas superficiales, especifica unos valores límite para el vertido de las estaciones de bombeo de aguas residuales (E.D.A.R) de compuestos de fosfato a las aguas receptoras: 2 mg/L fósforo total o 1 mg/L fósforo total. Las concentraciones críticas para una eutrofización incipiente se encuentran entre 0.1-0.2 mg/L PO₄-P en el agua corriente y entre 0.005-0.01 mg/L PO₄-P en aguas tranquilas [17]. La reglamentación colombiana especifica los criterios y los valores respectivos para evaluar las condiciones físicas, químicas y bacteriológicas de las aguas destinadas para consumo humano a través del Decreto 1575 del 2007, y establece como valor máximo admisible 0.5 mg/L para el ion fosfato [12].

En el presente trabajo se llevó a cabo la validación del método colorimétrico del ácido ascórbico para la determinación de fosfatos en aguas, se trataron resultados de análisis obtenidos de muestras de diferente procedencia con el ánimo de hacer lo más completo el estudio.

2. Parte experimental

El método original trabajado es el 4500-P E. APHA-AWWA-WEF (2005), contenido en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th Edition [11], este se vale de la reacción del molibdato amónico, el tartrato antimonílico potásico en medio ácido y la presencia de ortofosfatos para dar ácido hetero-poliácido fosfomolibdico que se reduce a azul de molibdeno, de color intenso por el ácido ascórbico. En este método se plantea, en la tabla que encabeza la página 4-154, el uso de celdas de 0.5, 1.0 ó 5.0 cm de paso óptico, según el rango de contenido de la muestra. Más abajo en el

texto (2.a.1), se contradice al plantear que el espectrofotómetro debe tener un paso de luz mínimo de 2.5 cm. Por tanto, no queda explícito que celda y para que concentraciones, utilizar. En nuestro caso se emplearon celdas de 1 ó 5 cm en función del intervalo de trabajo.

Asumiendo que el planteamiento del texto es correcto, el trabajar con celda de 1 cm sería una considerable modificación del método. Se evaluaron los siguientes parámetros: límite de cuantificación, límite de detección, precisión, exactitud, recuperación de adiciones conocidas (exactitud en matriz).

A continuación se muestra en detalle la ruta desarrollada:

- Colección, preservación y almacenaje de muestras:

Coleccionar sólo muestras puntuales y en frascos de vidrio previamente lavados. Deben analizarse sin dilución y en caso de requerirse almacenamiento por corto plazo, realizarlo por refrigeración a 4 °C o congelación a -20 °C por un tiempo no mayor de 24-48 horas.

Si la muestra de agua, no se va a analizar dentro de los dos días siguientes a la preparación, se puede preservar una alícuota con 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado por cada 100 mL de muestra para llevar a pH < 2 y almacenar a 4 °C. La muestra preservada se puede analizar tan pronto como sea posible pero dentro de un periodo máximo de 28 días [11].

- Equipos y materiales:

Espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo Aquamate Plus UV-VIS, para trabajar a 880 nm con celdas de 1 y 5 cm de paso óptico. Vidriería de borosilicato lavada con HCl diluido caliente (40-50 °C) y enjuagada con abundante agua destilada. De emplear detergentes, estos no deben contener fosfatos.

- Reactivos:

Para la preparación de reactivos, patrones y muestras, se empleo agua desionizada. Todos los reactivos son de grado analítico, excepto se indique alguna especificación. En función del consumo previsto y la caducidad de los reactivos, pueden prepararse volúmenes menores reduciendo proporcionalmente las cantidades empleadas.

Solución madre de Fosfatos (100 mg PO₄³⁻/L): Patrón certificado 99.4 mg PO₄³⁻/L trazable marca HACH.

Solución de ácido sulfúrico 5N: verter 70 mL de H₂SO₄ concentrado marca J.T BAKER al 97.9% de pureza, en un matraz aforado de 500 mL que contenga aproximadamente 400 mL de agua, agitar, enfriar y enrasar. Almacenar en frasco de vidrio ámbar hasta por 6 meses.

Solución de ácido ascórbico 0.1 M: pesar 1.76 g de ácido ascórbico, marca CARLO ERBA con un 99.0% de pureza, disolverlo y enrasar con agua en un matraz aforado de 100 mL. Es recomendable prepararla al momento de su uso aunque puede conservarse una semana en refrigeración, sacando de la nevera sólo la porción a utilizar.

Solución de molibdato de amonio al 4%: pesar 20 g de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ marca J.T BAKER con una pureza del 81.4%, disolverlo y enrasar con agua desionizada tipo I en un matraz aforado de 500 mL. Almacenar en frasco ámbar durante 6 meses pero desechar antes si ocurre precipitación.

Solución de tartrato doble de antimonio y potasio: pesar 1.3715 g de $(\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, marca CARLO ERBA al 99.5% de pureza, disolverlo con 400 mL de agua desionizada tipo I en matraz volumétrico de 500 mL y finalmente enrasar. Almacenar en frasco ámbar durante 6 meses pero desechar antes si ocurre precipitación.

Reactivo Combinado para Fosfato: se debe preparar al momento de su uso y usarse en las 4 horas subsiguientes. Por cada 100 mL, mezclar en el siguiente orden y agitando después de cada adición:

- 1- 50 mL de ácido sulfúrico 5 N
- 2- 5 mL de solución de tartrato de antimonio y potasio
- 3- 15 mL de solución de molibdato de amonio
- 4- 30 mL de solución de ácido ascórbico

Si aparece turbiedad, agitar y dejar reposar unos minutos hasta que ésta desaparezca [11].

• Procedimiento:

Las condiciones ambientales no son críticas para la realización de este ensayo.

A. Preparación de las curvas de calibración:

Se emplearon 2 curvas, una en intervalo bajo (0-0.40 mg/L) y otra en intervalo alto (0.1-3.0 mg/L).

1. Pipetear volúmenes crecientes de la solución patrón de fosfatos y completar a volumen con agua desionizada tipo I para obtener al menos seis concentraciones comprendidas en el intervalo deseado. Para el rango bajo 0.05, 0.07, 0.09, 0.20, 0.30, 0.35 y 0.40 mg/L PO_4 , en el rango alto se utilizaron patrones así, 0.25, 0.50, 0.75, 1.40, 1.60, 2.00, 2.50, 3.00 mg/L PO_4 .
2. Transferir los estándares a vasos de precipitado de 100 mL.
3. Añadir 1 gota de indicador de fenolfaleína; si desarrolla color rosado-

rojo, añadir gotas de H_2SO_4 5 N hasta desaparición del color.

4. Adicionar 8.0 mL de reactivo combinado y agitar.
5. Dejar en reposo por al menos 10 minutos para completar el desarrollo de color.
6. Antes de 30 minutos, leer en el espectrofotómetro a 880 nm con cubetas de paso óptico de 5 cm ó 1 cm.
7. En el espectrofotómetro Aquamate Plus UV-VIS, crear la curva de calibración
8. Verificación de las curvas de calibración:

Cada vez que se analicen muestras, no es necesario construir una nueva curva de calibración, sino verificar la validez de la existente. En este caso, se prepara un estándar de 0.20 ó 1.0 mg/L de PO_4 para el intervalo bajo o alto, respectivamente, y se lee como si fuera una muestra. Si el resultado es coincidente 10 %, se considera que la curva es válida y se procede a preparar y leer las muestras. En caso negativo, repetir el estándar. Si el problema persiste, verificar los reactivos, en particular, la solución madre de fosfatos y si es necesario, prepararlos y construir una nueva curva de calibración.

B. Determinación de fosfatos en muestras:

1. Transferir 50 mL de muestra (previamente filtrada por membrana de 0.45 m, en caso de ser necesario por presentar turbiedad superior a 2 UNT, medida con un Turbidímetro), a un vaso de precipitados de 100 mL. Adicionar 8.0 mL del reactivo combinado. Agitar para mezclar bien.
2. Esperar 10 minutos para el desarrollo del color. Preparar y analizar un blanco de reactivos con agua desionizada; para muestras de aguas marinas, Dejar reposar por 30 minutos a 2 horas [13].
3. Leer en espectrofotómetro a 880 nm con cubetas de paso óptico de 1 ó 5 cm respecto a la curva de calibración correspondiente.
4. Si la muestra se analiza inicialmente con la curva baja y la absorbancia resulta mayor a la de patrón superior, debe releerse con la curva alta. Si también resulta superior al mayor patrón de ésta, es necesario repetir el proceso mediante la lectura de diluciones de la muestra. Para esto, debe realizarse como mínimo dos diluciones, se calculará el coeficiente de variación y si éste no supera 10%, se informará el valor promedio; en estos casos, es necesario multiplicar previamente por el factor de dilución.

En función del espectrofotómetro utilizado, el resultado se obtiene directamente en la curva

de calibración del equipo. Se expresa con tres cifras decimales [11].

3. Resultados y discusión

De acuerdo con los protocolos de validación se evaluaron los siguientes parámetros: límite de cuantificación, este se halló con el promedio de la lectura de 7 blancos de agua desionizada, mas 10 veces la desviación estándar de estos, el límite de detección, se determino con el promedio de la lectura de 7 blancos de agua desionizada, mas 3 veces su desviación estándar, precisión, exactitud, recuperación de adiciones conocidas (exactitud en matriz) [14,15]. Por tratarse de un método en que se modifica el paso de luz, no es necesario evaluar: identificación, selectividad, especificidad ni robustez, ya que estos parámetros no son alterados por la modificación introducida [16].

A continuación se exponen e interpretan los resultados obtenidos en los ensayos de validación del método, que se realizaron siguiendo el procedimiento de análisis referenciado. En nuestro caso se emplearon celdas de 1 ó 5 cm en función del intervalo de trabajo. Asumiendo que el planteamiento correcto sea el consignado en el Standard Methods [10], sería considerable modificación el trabajar con celda de 1 cm. con base a los resultados experimentales se tiene:

Exactitud:

1. Pruebas de evaluación de desempeño del IDEAM: resultados satisfactorios entre 2008 y 2010 con puntajes de 100.
2. PICCAP: desempeño satisfactorio para fosfatos desde 2002.
3. Mollabs: en 1 ejercicio de agua potable, Zscore de -0.11.
4. Pruebas de añadido-recobrado:
 - agua cruda por triplicado, recobrados de 98.8 a 100.8
 - agua potable a dos niveles por triplicado, recobrados de 100.2 a 102.3

Precisión:

Tabla 1. Datos de repetibilidad

Tipo de muestra	CV% promedio	muestras
agua superficial (curva baja)	2.0-4.5	4
agua superficial (curva alta)	1.0-2.3	4
agua tratada (curva baja)	2.2-2.8	2
agua tratada (curva alta)	0.7	2
duplicados ciegos	1.1-5.4	5

Fuente: elaboración propia

Con base a los contenidos de fosfatos (0.1 a 1.3 mg/L) y la tabla de Horwitz, puede considerarse satisfactoria la repetibilidad.

Tabla 2. Datos de reproducibilidad interna

Tipo de muestra	CV %	muestras	notas
agua industrial	3.1-6.2	8	2 analistas iguales días
agua industrial	6.4	1	Igual analista, 2 días diferentes
estándar de 0.20 mg/L (curva baja)	3.5	21	1 analista durante 1 año
estándar de 1.0 mg/L (curva alta)	6.0	11	1 analista durante 10 meses
muestra certificada	2.8	1	Igual analista, 2 días diferentes
muestra certificada	7.3	1	Igual analista, 2 días diferentes

Fuente: elaboración propia

Las curvas de calibración se evaluaron con el software estadístico Kalibo arrojando evidencias de linealidad con coeficientes de correlación de 0.99954 (rango bajo) y 0.99879 (rango alto) y coeficientes de variación del método, para la curva baja de 4.38% y para curva alta de 6.65%; siendo datos satisfactorios, ya que se cumple con los criterios aceptados de 0.995 y 10% para coeficientes de correlación y variación respectivamente [10].

Tabla 3. Curvas de calibración

Curvas	Baja (celdas 5 cm)	Alta (celdas 1 cm)
Intervalo de trabajo (mg/L)	0.05-0.40	0.25-3.0
Límite de detección ($X_{bl} + 3 S_{bl}$) (mg/L)	0.009	No aplica
Límite de cuantificación ($X_{bl} + 10 S_{bl}$) (mg/L)	0.029 (0.03)	No aplica
Probabilidad de 2° orden (%)	21.8	9.8
CV método (%)	4.4	6.7

Fuente: elaboración propia

Dado que la legislación para agua potable considera 0.5 mg/L como valor máximo aceptable para fosfatos [12], el límite de cuantificación obtenido (16 veces menor), se considera satisfactorio para el análisis de este tipo de agua.

Tabla 4. Comparación entre curvas

Curvas	m	Factor entre pendientes
Baja	0.9951	4.8236 real
Alta	0.2063	5.0 teórico

Fuente: elaboración propia

Respecto a las Pendientes:

La pendiente de la curva real es 96.5 % del valor teórico.

Los valores de absorbancia de los patrones de la curva baja, fueron extrapolados a la curva alta, dividiendo tanto entre el factor real como entre el teórico y las absorbancias obtenidas fueron empleadas para leer las concentraciones resultantes. Finalmente, se halló en cada caso el error (%) respecto al valor teórico de cada patrón:

Errores con base a factor teórico: $-3.9 a +0.1\%$

Errores con base a factor real: $-0.5 a +3.7\%$

Muestras leídas en ambas curvas:

Dos muestras con concentraciones cercanas a 0.3 mg/L, una de agua cruda y otra de agua tratada, se analizaron por triplicado en ambas curvas. La precisión como CV, fue de 3.2 y 5.6%, respectivamente y ninguno de los 6 datos de cada conjunto, fue rechazado. Esta precisión es satisfactoria [17].

Los resultados obtenidos en 1 y 2, confirman que ambas curvas dan resultados equivalentes y por tanto, que el emplear celdas de 1 cm en aras de extender el intervalo de trabajo, sin necesidad de hacer diluciones, no disminuye los atributos del método.

4. Conclusiones

De forma detallada, las conclusiones que se extraen del presente estudio, se pueden puntualizar de la siguiente manera:

- El método estandarizado modificado se fundamenta en aprovechar las potencialidades de las reacciones de coloración con ácido ascórbico y de la espectrofotometría con detección visible. Esta combinación proporciona una técnica fiable y rápida.
- El procedimiento propuesto presenta adecuadas características de desempeño, por lo que puede definirse como un método preciso (coeficientes de variación <10%), veraz (no presenta sesgo significativo), con un adecuado intervalo de concentración y un límite de detección relativamente bajo (0.03 mg/L). Estas características permiten que el mismo se ajuste al propósito para el cual fue diseñado, que consiste en la determinación de fosfato en muestras de aguas de diferente procedencia.
- De acuerdo con los resultados obtenidos el método de análisis de fosfato en agua por el método colorimétrico del ácido ascórbico, se ajusta al uso propuesto y es adecuado para ser aplicado en las condiciones particulares del laboratorio de calidad de aguas, de la empresa aguas de Cartagena SA ESP.

5. Referencias

1. Díaz, W.; Gonzaga, B. y Contreras, N. 2007. Determinación del Coagulante que permita la máxima remoción de Fosfatos en agua cruda del río Otún. *Scientia Et Technica*. XIII/034: 607-612.
1. Romero, J. 2002. *Calidad del agua*. 1ª Edición. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. Colombia.
2. Holtan, H.; Kamp-Nielsen, L. y Stuanes, A. 1988. Phosphorus in soil, water and sediment: an overview. *Hydrobiologia*, 170:19-34.
3. Lean, D. 1973. Movements of phosphorus between its biologically important forms in lake water. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 30:1525-1536.
4. Romero, J. 1996. *Acuiquímica*. 1ª Edición. Escuela Colombiana de Ingeniería. Colombia.
5. Cheng, H.; Hu, Y. y Zhao, J. 2009. Meeting China's Water Shortage Crisis: Current Practices and Challenges. *Environmental Science and Technology Journal*. 43(2): 240-244.
6. Jiménez, B. 2001. *La contaminación ambiental en México: Causas, efectos y tecnología*, 2a edición. Limusa. México.
7. Arboleda, J. 2000. *Teoría y práctica de la purificación del agua*. Editorial Mc Graw Hill. Colombia.
8. Simanca, M.; Álvarez, B. y Paternina, R. 2010. Calidad física, química y bacteriológica del agua envasada en el municipio de Montería. *Temas Agrarios*. 15:(1) 71-83.
9. EPA. 2007. Part III, 40 CFR, Part 122, 136 et al. Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants Under the Clean Water Act: national Primary Drinking Water regulations; and National Secondary Drinking Water Regulations; Analysis and Sampling Procedures; Final Rule.
10. AWWA-WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21th Edition. New York, 4-139 a 4-141, 4-144, 4-146 y 4-147, method 4500-PA, C y E.
11. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, MINISTERIO DE AMBIENTE VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. 2007. Resolución 2115 de 2007, Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. Colombia.
12. Rodier, J. 1990. *Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar*. Ediciones Omega, S.A. España.
13. Cortes, G. 1999. *Lineamientos para el control de calidad analítica*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. Colombia
14. Cortés, C. y García, R. 2009. Validación con base en los criterios de aplicación de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 en mediciones químicas y físicas. Entidad Mexicana de Acreditación. México, DF.
15. Cortés, C. 2010. Validación de métodos. Docto. No. MP-CA005-02 Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). México.
16. Miller, J. y Miller, J. 1993. *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamericana. Segunda Edición. México.
17. Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local de Navarra, España. http://www.navarra.es/home_es/Temas/Medio+Ambiente/Agua/Documentacion/Parametros/ParametrosNutrientes.htm (accesado el 11 de Octubre de 2012).