INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

PROYECTO MULTINACIONAL DE CIENCIAS DEL MAR OEA – IMARPE

"PRODUCTIVIDAD DE LAS AGUAS COSTERAS FRENTE AL PERÚ"

ANALISIS QUIMICOS DEL AGUA DE MAR POR INSTRUMENTACION

Oscar Guillén y Rosa Aquino

CALLAO-PERU, 1977

© Instituto del Mar del Perú
Esquina Gamarra y General Valle s/n.
Teléfono 297630
Apartado postal 22
Callao, PERU.

Hecho el depósito de ley.
Reservados todos los derechos de reproducción total o parcial, la fotomecánica y los de traducción.

Impreso en el Perú
Editorial y Librería Salesiana
Av. Brasil 218 — Lima

Conducción editorial: Pedro A. Rodríguez Vidal

ANALISIS QUIMICOS DEL AGUA DE MAR POR INSTRUMENTACION

OSCAR GUILLEN Y ROSA AQUINO

Laboratorio de Oceanografía Química y Productividad del Instituto del Mar del Perú

(Tablas 1-2 Figuras 1 - 19)

Análisis por Instrumentación Pág.

Introducción 1
Determinación del pH 2
Análisis por espectrofotometría en la zona visible y ultravioleta. 4
Análisis por espectrofotometría en el infrarrojo. . 7
Análisis por espectrofotometría de absorción atómica 10
Análisis de nutrientes con el Autoanalizador "Tecnicón" 12
Análisis por foto-oxidación ultravioleta 14
Análisis por cromatografía de gases 15
Análisis por Trifosfato de Adenosina (A.T.P.) . . 17
Análisis por fluorescencia 19
Determinación por el sistema de centelleo líquido. 20
Descripción del Instrumento LS-100 C. Liquid Scintillation System 22

Determinación de la materia orgánica

Análisis de materia orgánica soluble 24
Determinación de carbón orgánico 24
Determinación de fósforo orgánico 25
Determinación de nitrógeno orgánico 27
Análisis de materia orgánica particulada 29
Determinación de partícula de carbón 29
Determinación de partícula de fósforo 30
Determinación de partícula de nitrógeno 32
Bibliografía citada 34

INTRODUCCION

El presente volumen constituye la complementación del trabajo titulado "Análisis Químico y de Productividad en el Agua de Mar", que fue publicado en el año 1972, y comprende la determinación de oxígeno, salinidad, nitratos, nitritos, amoníaco, silicatos, fosfatos, carbono 14 y clorfila "a" en el agua de mar.

La segunda parte que se presenta a continuación consta de dos capítulos:

a) Introducción al Análisis Instrumental,
b) Determinación de la Materia Orgánica en el agua de Mar.

En el primer capítulo se describe los conocimientos básicos para el manejo y uso de los instrumentos que existen en el Laboratorio de Oceanografía Química y Productividad del **Instituto del Mar del Perú.**

En el segundo capítulo se describe la metodología que se usa actualmente en el Instituto del Mar del Perú para la determinación de la materia orgánica en el agua de mar en forma soluble y particulada cuyos métodos ya han sido probados y experimentados en su oportunidad.

Debido a los complejos problemas analíticos que presenta la Oceanografía Química especialmente en los microanálisis, se recomienda el uso de los métodos instrumentales los cuales tienen la ventaja de dar mayor precisión en un menor tiempo de análisis.

El presente trabajo ha sido preparado para que sirva de guía práctica en los estudios de oceanografía química y productividad a los becarios del Proyecto Multinacional de la OEA "Productividad de las Aguas Costeras frente al Perú", y a los estudiantes universitarios.

I. ANALISIS POR INSTRUMENTACION DETERMINACION DEL pH

1. Introducción

La medida de la concentración de una solución ácida o básica es expresada por su potencial hidrógeno o pH.

Durante las mediciones se determina la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y electrodo indicador, éste último varía su potencial proporcionalmente a la concentración de iones hidrógeno mientras que el electrodo de referencia mantiene su potencial constante.

Ambos electrodos sumergidos en la solución son medidos por medio de un galvanómetro adecuado obteniéndose como resultado la medida del pH.

2. Fundamento

El pH es definido como el logaritmo negativo de la actividad del ión hidrógeno:

$$pH = -\log a_{H^+} \qquad (1)$$

La actividad del ión hidrógeno está relacionado con la concentración:

$$a_{H^+} = \gamma_{H^+} \cdot C_{H^+} \qquad (2)$$

donde:

a_{H^+} = es la actividad del ión hidrógeno.
γ_{H^+} = es el coeficente de la actividad termodinámica del ión hidrógeno en la solución específica.
C_{H^+} = es la concentración del ión hidrógeno.

El coeficiente de actividad es una función del solvente de una fuerza total de los iones y del ión específico disuelto en el solvente: El agua pura es un electrolito débil y se disocia de acuerdo a la ecuación:

$$H_2O \leftrightarrows H^+ + OH^- \qquad (3)$$

$$K_{H_2O} = \frac{a_{H^+}\, a_{OH^-}}{a_{H_2O}} \qquad (4)$$

para el agua pura a_{H_2O} es la unidad.

El producto iónico termodinámico es:

$K_{H_2O} = a_{H^+} \cdot a_{OH^-}$; tiene un valor de 10^{-14} a 22°C.

donde:

$$a_{H^+} = a_{OH^-} = \sqrt{K_{H_2O}} \qquad (5)$$

$$a_{H^+} = 1.0 \times 10^{-7} \qquad (6)$$

Si se reemplaza este valor en la ecuación (1), se demuestra que el pH del agua pura en el punto neutro es 7.

3. Instrumental

El medidor del pH consta de las siguientes partes:

a) Circuito eléctrico.

b) Electrodo de medición.

a) Circuito eléctrico:

El esquema descrito a continuación pertenece a varios instrumentos tales como: Beckman, Coleman, y Northrup y su funcionamiento es el siguiente:

El potenciómetro X Y Z se calibra directamente en unidades de pH donde el voltaje que corresponde a una división del potenciómetro se ajusta de acuerdo a la temperatura de la solución cuyo pH va a medirse.

La variación del voltaje puede calcularse según la ecuación:

$$V = b + 1.983 \times 10^{-4} . T . pH$$

V = voltaje que varía linealmente en el pH.
b = constante que depende de los potenciales de los electrodos y de la diferencia de potencial a través de la pared de vidrio para pH = O.

1.983×10^{-4} es el coeficiente de la ecuación de Nernst.

T = temperatura absoluta.

El ajuste de temperatura se hace con el potenciómetro XYZ y con la resistencia Rt. La corriente total que circula por la resistencia Rt. y XYZ que se encuentran en paralelo, se ajustan a un valor constante, disminuyendo Rt con el voltaje XYZ.

El aparato se calibra con una solución Buffer de pH conocido, con el contacto Z se coloca el valor del pH de la solución Buffer o Tampón, y luego se ajusta al potenciómetro Pc hasta conseguir el equilibrio estando el interructor K en la posición 2; como la resistencia de la pila es muy alta el indicador de equilibrio G es un voltímetro de válvula termoiónica.

El potenciómetro pH sirve para corregir las variaciones del término b.

La determinación de un pH desconocido se hace reemplazando la solución buffer por la solución desconocida y mediante el interruptor Z.

b) Electrodo de medición:

Electrodo de vidrio: Es el electrodo frecuentemente usado. Consiste en un bulbo de pared muy fina de vidrio especial que contiene un electrodo y una solución patrón de referencia. El tubo de vidrio está lleno con una solución de HCl; el electrodo es de plata cubierto con cloruro de plata (AgCl). El fundamento de la medición de pH con el electrodo de vidrio (electrodo indicador) está basado en la calibración del sistema con una solución de pH conocido; es decir mediante la fuerza electromotriz de la solución de pH desconocido.

El pH desconocido a 25°C se puede calcular de la siguiente manera:

$$pHx = pHi + \frac{Ei - Ex}{NF}$$

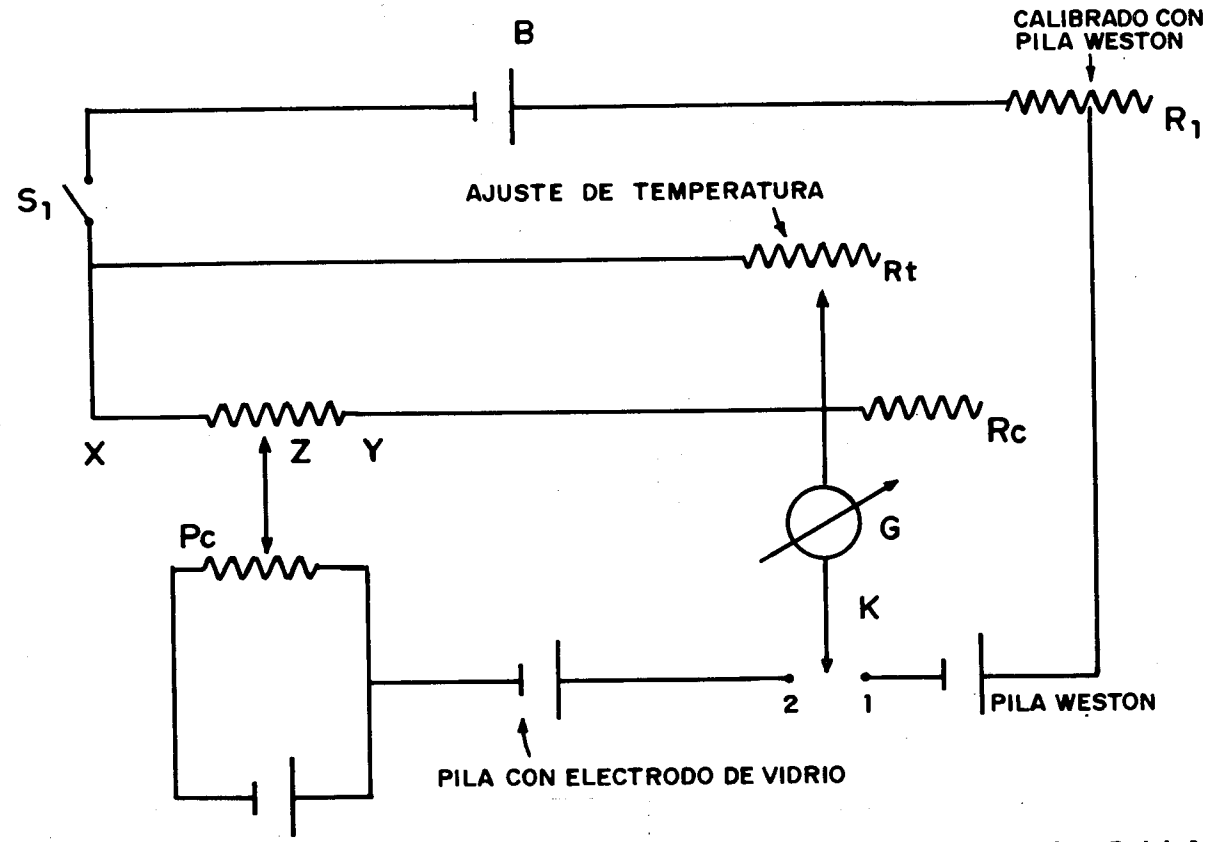


Fig. 1 ESQUEMA DEL CIRCUITO ELECTRICO DEL MEDIADOR DE PH. (Tomado del Manual Análisis Instrumental por Paul de La Hay)

Donde:

pHi = es el pH de la solución estándar (buffer).
Ei = es la fuerza electromotriz de la solución estándar (buffer).
Ex = es la fuerza electromotriz de la solución desconocido.
NF = control de la pendiente de temperatura en mV/pH.
(0.05915 milivoltios a 25°C).

El electrodo de Calomel: Es el llamado electrodo de referencia y consta de una semicécula que se representa de la siguiente manera:

Hg^0,(Hg_2Cl_2) en solución de KCl conocida.
centración de los iones mercuriosos (Hg_2++) de la solución, debido a que la concentración de iones cloruros causan una solubilidad diferente del calomel.

La pila puede presentarse como sigue:
Ag, AgCl, HCl: solución desconocida: KCl (saturada): Hg_2Cl_2, Hg^0.

Electrodo de vidrio Electrodo de calomel

4. Metodología

En el caso del agua de mar
Para calcular su pH se usa la siguiente fórmula:

$$pHs = pHm + L\ (t - tm)$$

Donde:
pHs, es el pH in situ,
pHm, es pH medido en el instrumento;
L, es constante, igual a 0.0118
t, temperatura in situ,
tm temperatura de la muestra.

Esta fórmula es válida para áreas cuyas profundidades no sean mayores de 1,000 metros; para mayores profundidades es necesario hacer la corrección con la aplicación de la siguiente fórmula:

$$pH\ in\ situ = pH\ medido + L\ (t_1 - t_2) - \beta\ Z$$

Donde:

L = 0.0118
($t_1 - t_2$), es la diferencia de temperaturas entre la temperatura medida y la temperatura in situ.
B. Z = Corrección por la diferencia de presión entre la profundidad de la muestra y la del laboratorio.
Z es la profundidad en metros y β es obtenida de la tabla siguiente:

pH medido	β
7.5	35×10^{-6}
7.6	31
7.7	28
7.8	25
7.9	23
8.0	22
8.1	21
8.2	20
8.3	20
8.8	20

5. Aplicaciones

1. Para determinar el pH de cualquier solución, ácida o básica.
2. En las valorizaciones ácido-base de ácidos débiles y en los medios coloreados y no acuosos. Esto se realiza cuando los indicadores no dan resultados satisfactorios.
3. En las valoraciones de precipitación de sustancias inorgánicas. Ejem.: cloruros con sal de plata.
4. En la valoración de sustancias orgánicas.
5. A veces es posible combinar una reacción electrolítica de oxidación reducción en la que figuran dos compuestos solubles con una reacción de precipitación. Ejem.: se puede valorar una solución de yoduros con ion plata en presencia de una cantidad pequeña de iodo.

6. Manejo del instrumento

Beckman pH Meter H5

1. Se conecta el potenciómetro al circuito de corriente y se deja calentar por espacio de 15 a 45 minutos.
2. Se mide la temperatura de la muestra en el laboratorio, con la ayuda de un termómetro.
3. Se calibra el instrumento con una solución buffer de pH 7 a 25°C; en el caso del agua de mar se preparan dos buffer para la calibración:

Buffer de pH = 6.865 (a 25°C)
Buffer de pH = 8.459 (a 25°C)

4. Se estandariza el instrumento de la siguiente manera:
4.1 Se lava el electrodo con agua destilada y luego se seca con papel de filtro.
4.2 En un vaso limpio y seco se vierte la solución buffer, ya que ésta no se elimina y debe ser devuelta a su frasco original.
4.3 Se introducen los electrodos a la solución buffer de pH conocido.
4.4 Se lleva la aguja indicadora de escala de pH hasta el pH indicado por la solución buffer, girando el botón "Asymetry".
4.5 Cuando la lectura del pH de la solución buffer es constante, se da por finalizada la estandarización.
5. Se repite el paso (4.1).
6. Se introduce el electrodo en la muestra problema y se realiza la lectura correspondiente.
7. Se repite el paso (4.1).
8. Cuando se termina de hacer las lecturas, se deja el electrodo en agua destilada.

Soluciones Buffer

1. Bates 1:3.5 Potasium dihydrogen phosphate KH_2PO_4, 1.179 g y disoduim hydrogen phosphate, Na_2HPO_4, 4.30 g son disueltos en agua destilada libre de carbonatos y llevados a un litro.
2. Bates 1: 1 Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, 3.39 g y disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4, 3.53 g son disueltos en agua destilada libre de carbonatos y llevados a un litro.
3. Palitzsch borax buffer. Sodium tetraborate, $Na_2B_4O_7.10H_2O$, 9.554 g, boric acid, H_3BO_3, 6.202 g y Sodium chloride, NaCl. 1.462 g son disueltos en agua destilada libre de carbonatos y llevados a un litro.

NOTA: Las sales de sodio y potasio deberán ser secadas antes de pesarlas y es recomendable guardarlas en un desecador con silica-gel.

TABLA Nº 1

Valores de pH de los buffer

Temp. C°	Bates 1:3.5	Bates 1:1	Palitzsch borax
0	—	6.984	—
5	—	6.951	—
10	7.472	6.923	—
15	7.448	6.900	—
20	7.429	6.881	8.510
25	7.413	6.865	8.459
30	7.400		

ANALISIS POR ESPECTROFOTOMETRIA EN LA ZONA VISIBLE Y ULTRAVIOLETA

1. INTRODUCCION

El análisis espectrofotométrico abarca una importante rama del estudio de la espectroscopia molecular. Debido a su gran exactitud y rapidez es usado en la industria y en la investigación.

Se usa en los análisis cualitativos y cuantitativos, dependiendo su exactitud del equipo y método empleado.

2. FUNDAMENTO

La espectrofotometría se basa principalmente en una característica física fundamental de las sustancias, el espectro molecular. El análisis cuantitativo se basa en la ley de Lambert-Beer, la cual relaciona la intensidad de la luz absorbida con la concentración de la sustancia :

$$I_0 \longrightarrow \boxed{L} \longrightarrow I_t$$

Celda con la muestra

Donde:

k = coeficiente de extinción característico de la muestra o absortividad,
c = concentración de la muestra en gr/l,
L = espesor de la celda o longitud del trayecto óptico en cm,
I_0 = intensidad de la luz incidente,
I_t = intensidad de la luz trasmitida,
A = absorbancia.

En la práctica es más usual la siguiente fórmula:

$$A = kcl, \qquad A = \log_{10} \cdot \frac{I_0}{I_t}$$

3. INSTRUMENTAL

El espectrofotómetro Beckman Modelo DU-2, consiste de cinco unidades funcionales: la fuente de poder, la fuente de luz, el monocromador, el compartimiento de la celda y la combinación del fototubo y el amplificador.

1. La fuente de poder; provee un estabilizador de voltaje para el potencial de la fuente de luz, el fototubo y el amplificador.

2. La fuente de luz (Fig. Nº 2): contiene dos fuentes intercambiables: una lámpara de tungsteno y una lámpara de hidrógeno o deuterio. La primera es usada en la región visible del espectro, de 320 mμ a 1000 mμ y la segunda es empleada para la luz ultravioleta, de 190 mμ a 375 mμ.

usados en diferentes partes del espectro para minimizar las fugas de luz.

4. Los compartimientos de las celdas; pueden ser de diferentes formas y longitudes de celda: rectangulares (10 mm) y tubulares (20, 50 y 100 mm).

5. La combinación del fototubo y el ampliador: consiste en que la luz que atraviesa la muestra llega al fototubo detector. La fotocorriente inducida por la luz incidente fluye a través de una resistencia y produce una caída de voltaje DC. Dicho voltaje es convertido a señales AC, en donde la frecuencia es la misma que la línea de potencia.

Luego esta señal AC es amplificada. La salida del amplificador es rectificada sincronizadamente con referencia a AC de la línea de potencia. La corriente DC así producida fluye a través del medidor, cuya deflexión de la aguja es proporcional a la intensidad de la luz incidente sobre el fototubo.

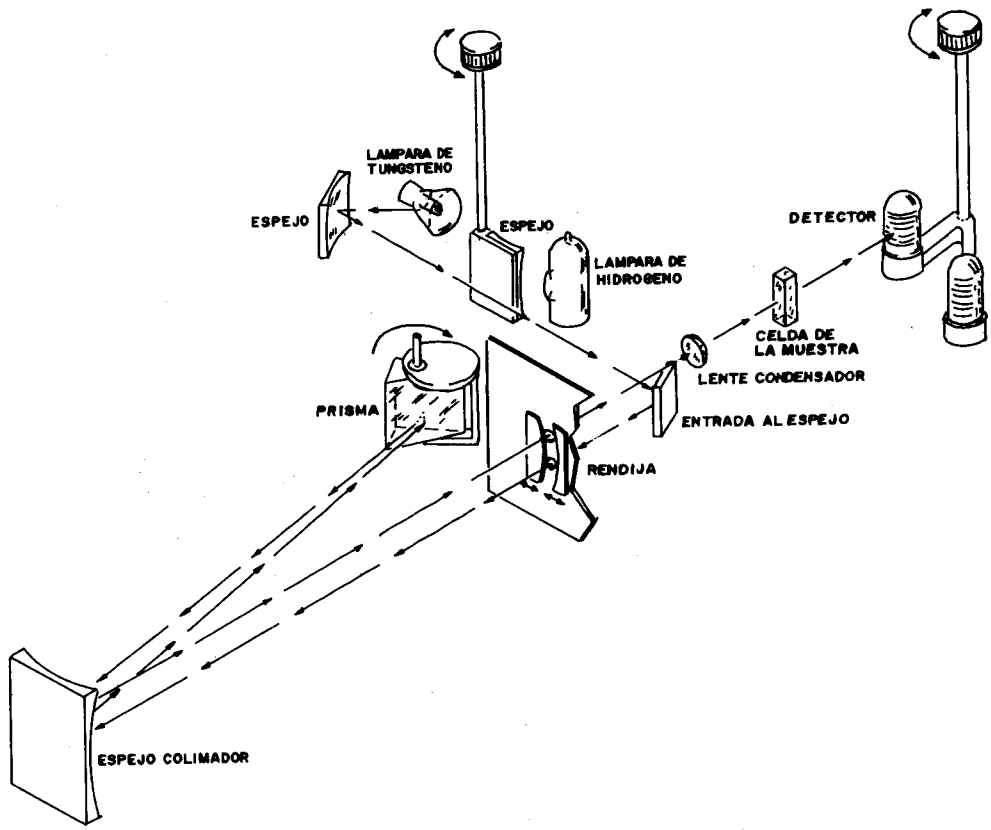


Fig. 2 DIAGRAMA DE CIRCUITO OPTICO DEL ESPECTROFOTOMETRO Beckman DU-2.
(Tomado del Manual de Instrucción Espectrofotómetro Beckman)

3. El monocromador (Fig. Nº 2): tipo Litrow, es usado en el espectrofotómetro para producir radiación de alta pureza espectral. Tiene dos rendijas: una de entrada en la cual la imagen de la fuente de luz es reflejada y otra de salida. El haz de luz que atraviesa la entrada de la rendija es dirigida al espejo colimador en forma paralela y luego al llegar al prisma es dispersado. El espectro así producido es reenfocado por el espejo colimador sobre la rendija de salida y la luz de longitud de onda seleccionada atraviesa la rendija de salida y la celda que contiene la muestra para luego llegar al fototubo detector. Antes de ingresar a la rendija de entrada hay tres filtros, los cuales son

4. METODOLOGIA

Se presentan los siguientes casos:

1. Cuando no se conoce la longitud de onda, se selecciona el rango de absorción o transmisión máxima (se construye un gráfico % de transmisión vs. longitud de onda).

2. Cuando se conoce la longitud de onda previamente, se realizan las lecturas de % de transmisión de las soluciones patrones a diferentes concentraciones (se construye el gráfico absorbancia vs. concentración).

El cálculo de la concentración de la muestra se realiza con la ayuda del gráfico absorbancia vs. concentración. (Fig. Nº 3).

Durante los análisis es necesario tener en cuenta lo siguiente:

1. Las soluciones a medir deben estar libre de partículas en suspensión.
2. El pH de la solucion tiene un efecto importante en el equilibrio de las soluciones.
3. El solvente empleado debe ser el mismo en los patrones y en la muestra.
4. La precisión y exactitud está dada por la sensibilidad del método empleado en los análisis.

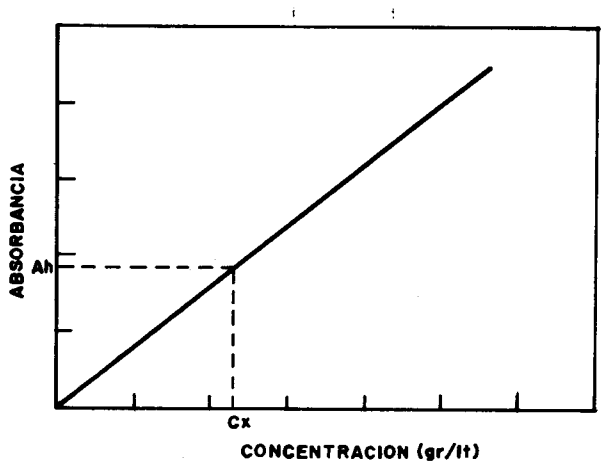


Fig. 3 ABSORBANCIA VS. CONCENTRACION

Ah = Abs. de la muestra desconocida
C = Concentración de la muestra desconocida.

5. APLICACIONES

La espectrofotometría en el visible y en el ultravioleta tiene las siguientes aplicaciones:

1. En la identificación de un compuesto y en la determinación cualitativa de la pureza de una sustancia.
2. En la determinacion de la estructura molecular.
3. En los análisis cualitativos y cuantitativos de mezclas o radicales, tales como fosfatos, silicatos, nitratos en el agua de mar, etc.
4. En el estudio de la velocidad y del mecanismo de las reacciones químicas, tales como las de polimerización de macromoléculas, en la bioquímica, biología, etc.

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

1. Se coloca (5) "Shutter Switch" en posición "CLOSE".
2. Se pone (12) "Function Switch" en posición "CHECK 100".
3. Se coloca (17) "Zero Suppression Switch" en posición "OFF".
4. Se pone (18) "Screen Bias Switch" en posición "3".
5. Se coloca (14) "Power Switch" en posición "ON".
6. Se gira (15) "Filament Temperature Switch" a posición "OFF" (a).
7. Se deja 3 minutos para que se estabilice el sistema (b).
8. Se selecciona la lámpara de tungsteno girando (1) "H_2 Source Selector" en sentido contrario a las agujas del reloj (c).
9. Se gira (2) "Tungsten lamp Switch" en posición "ON" el que está colocado en la parte de atrás (d).
10. Con (3) "Phototube Selector" se selecciona el rango de longitud de onda a trabajar.
11. Cuando se opera con el "Photomultiplier" se coloca (16) "Photomultiplier Gain Switch" en posición "5".
12. Se coloca (14) "Load Resistor swich" en posición correcta para el fototubo seleccionado.
13. Se pone (8) "Sensitivity control" en posición media.
14. Se gira (13) "Wavelength Selector" para seleccionar la longitud de onda a trabajar.
15. La celda de referencia y las celdas con las muestras se coloca en el compartimiento para las celdas (e).

OPERACION

16. Con (11) "Transmittance-Absorbance Control" se coloca en cero la absorbancia.
17. Se ajusta con (10) "Dark Current Control" para balancear la aguja en cero. Si la aguja se desplaza a la izquierda se mueve (10) en sentido de las agujas del reloj, si la aguja se mueve a la derecha, se gira (10) en sentido contrario a las agujas del reloj.
    Si (10) "Dark Current Control" no se mueve de la izquierda, se gira (18) "Screen Bias Switch" a la izquierda de la posición "3"; lo contrario si la aguja se pega a la derecha. Cuantas veces sea necesario se reajustará (10) para balancear la aguja a cero.
18. Con (6) "Sample Positioner" se coloca la celda de referencia en posición del rayo de luz.
19. Se gira (5) "Shutter Switch" en posición "OPEN". Generalmente la aguja se mueve de cero.
20. Se lleva la aguja a cero con (9) "Slit Control" y con (8) "Sensitivity Control". Si la aguja se pega a la izquierda el signal óptico es demasiado grande, por consiguiente el Slit Switch deberá ser reducido con ayuda de (9) "Slit Control" o la sensibilidad disminuirá con ayuda de (8) "Sensitivity Control".
21. Con (5) "Shutter Switch" se lleva a CLOSE.
22. Con (6) "Sample Positioner" se mueve la celda que contiene la muestra en posición del rayo de luz.
23. Se ajusta (12) "Function Switch" a la escala de 0 - 100 (g).
24. Con (11) "Transmittance-Absorbance Control" se balancea la aguja a cero.
25. Se lee la extinsión en la escala inferior directamente cuando se usa la escala de 0 - 100 (h) e (i).

NOTAS

a. Se coloca en posición "Warm-UP" si se usa lámpara de hidrógeno, además deberá girarse (19) "Source Circuit Switch" a posición H_2.
b. El tiempo completo de la estabilización es aproximadamente una hora.
c. En sentido de las agujas del reloj para la lámpara de hidrógeno.
d. Cuando se usa la lámpara de hidrógeno se deja (15) "Filament Temperature Switch" por espacio aproximado de 30 segundos en posición "WARM UP". Se enciende la lámpara girando el switch a posición 1. Después que la lámpara se ha encendido se coloca "el switch" a posición 6 ó a números más altos en el cual la lámpara es estable. La lámpara está encendida cuando emite un característico resplandor morado.
Si la lámpara no calienta se regresa "el switch" a posición "WARM UP" por un intervalo más grande y luego nuevamente se coloca en posición 1.
e. Siempre debe cuidarse que (5) "Shutter Switch" permanezca en posicion "CLOSE" antes de abrir el compartimiento de la muestra porque de lo contrario los fototubos pueden malograrse por la luz del laboratorio.
f. Se ajusta (12) "Function Switch" en la escala de 0-10 para muestras de mínima transmitancia (10%) y 90-100 para muestras de altísima transmitancia (90-100% de transmitancia).
g. Cuando se usa de 0-10 se adiciona 1 a cada valor. Ejemplo: 0.126 se debe leer 1.126.
h. En la escala superior se lee el % de transmisión.
i. 0 — 110% T. en el rango 0 — 100,
0 — 11% T. en el rango 0 — 10, y
90 — 110% T. en el rango 90 — 100.

ANALISIS POR ESPECTROFOTOMETRIA EN EL INFRARROJO

1. INTRODUCCION

La espectrofotometría IR es ideal para análisis cualitativos y cuantitativos de sustancias orgánicas. También se aplica a compuestos inorgánicos en forma limitada, debida a la intensa absorción por el agua de la radiación IR.

Abarca un rango de 0.8 µ a 1000 µ de longuitud de onda (λ) en el espectro de la luz y está subdividida en tres regiones.

IR, cercano (0.8 - 2.5 µ): Región de los sobretonos, en el cual se trabaja con óptica de cuarzo y representa un espectro de vibración-rotación.

IR, medio (2.5 - 50 µ): Comprende regiones del espectro de vibración-rotación dando bandas fundamentales de los grupos funcionales, por lo tanto se usa:
NaCl . . . 2.5 a 15 µ de λ (longitud de onda)
BrK . . . 2.5 a 30 µ de λ (longitud de onda)
BrCs . . . 2.5 a 50 µ de λ (longitud de onda)

IR, lejano (50 - 1000 µ): Comprende la región del espectro de rotación molecular.

2. FUNDAMENTO

Se basa en el fenómeno de absorción de la radiación por las moléculas de gases, líquidos o sólidos en la región del IR medio (2.5-50 µ).

La absorción en el IR es muy activa, ya que todas las sustancias tienen absorción en esta región, sea orgánica o inorgánica, mostrando generalmente muchas bandas que están completamente relacionadas con la presencia de ciertos grupos de átomos llamados grupos funcionales y con la estructura de la sustancia.

El espectro de una sustancia que se produce en la región IR está representado por una serie de bandas que tienen su origen en los cambios que ocurren en los movimientos de vibración y rotación de la molécula.

Movimiento de vibración es una fuerza de repulsión (núcleos) y atracción (electrones), como consecuencia de fuerzas opuestas: la repulsión de los núcleos atómicos en la molécula y la atracción de la fuerza de enlace debido a los electrones de valencia. Los cambios de la frecuencia dan lugar a la absorción de la radiación.

En un registro IR se muestra lo que ocurre dentro de las moléculas (o de sus grupos funcionales) tales como: $-OH$, $-NH_2$, $-CO$, $=CO$, $\equiv CH$, $=CH_2$, $-CH_3$ y otros; mientras que en los registros de ultravioleta se muestra lo que sucede entre y dentro de los niveles electrónicos en el interior de los átomos de la muestra.

Como estos grupos funcionales absorven energía característica a una longuitud de onda y a una frecuencia determinada, hacen posible identificar a ellos en una muestra, usando varias técnicas de IR.

3. INSTRUMENTAL

Una representación esquemática del instrumento IR es mostrada en la Fig. 5 la cual puede trabajar indiferentemente en los modelos de doble haz y de simple haz.

En el modelo de doble haz, la fuente emite radiación IR estable, la cual es separada en dos haces. Un haz es dirigido al trayecto de la muestra y el otro al trayecto de referencia del compartimiento de la muestra. A través del compartimiento de la muestra cada haz es dirigido al mecanismo alternador de haces, el cual consiste en dos espejos que rotan alternativamente dirigiendo a los dos haces a lo largo de sus respectivas trayectorias a 10 ciclos por segundo. Del espejo alternador de haz los haces van directamente hacia un trayecto idéntico en el pulso alterno de energía, los cuales son filtrados por uno de los seis filtros interferentes, el cual transmite solamente regiones específicas del espectro. Los haces transmitidos de energía radiante pasan a través de la rendija de entrada al monocromador en donde son reflejados por un espejo colimador sobre una de las dos salidas de precisión de la red de difracción. La red dispersa de la radiación incidente es reflejada regresando al espejo colimador. La radiación dispersada es dirigida sobre la rendija de salida. Como la red gira, una banda cerca de la radiación emerge de la rendija de salida y es dirigida al detector termocupla. Cuando los haces de la muestra y de la referencia son de igual intensidad, el sistema detector no genera señal. Sin embargo, cuando la muestra absorbe energía los haces son de intensidad diferente, los cuales gene-

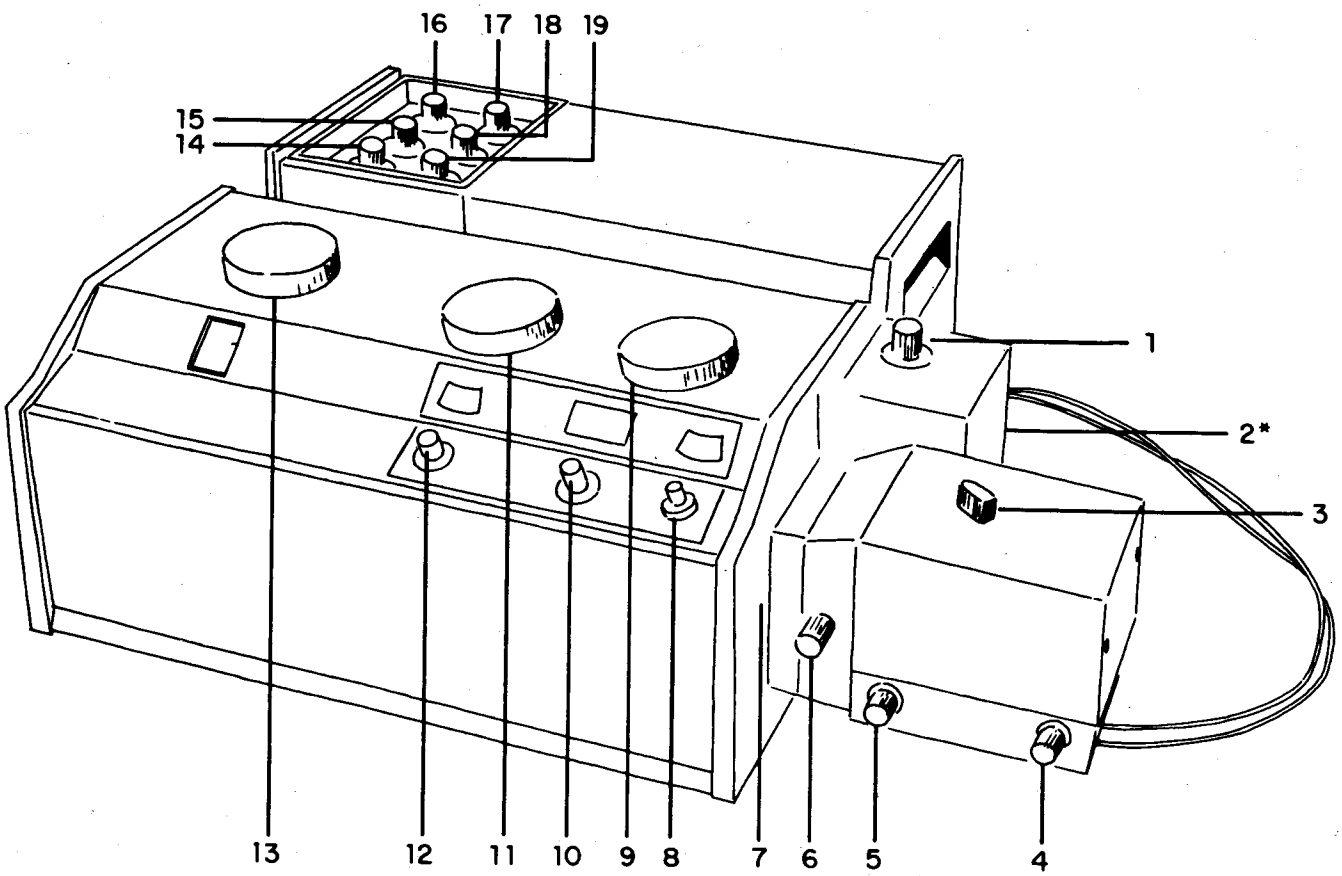


Fig. 4 ESPECTROFOTOMETRO Beckman DU-2 (Tomado del Manual de Instrucción Espectrofotómetro Beckman)

ran una señal en el sistema detector, la cual es proporcional a la diferencia de energía de los dos haces. En contestación a esta señal un atenuador óptico es instalado en el trayecto de referencia para decrecer la energía de la referencia hasta que el balance sea restaurado. Como el registro va mecanicamente parejo a la posición cero del atenuador óptico, éste da una indicación directa de la transmitancia, registrándose un espectro de la muestra, transmitancia vs. longitud de onda o número de onda.

4. METODOLOGIA

En los análisis de IR cualitativos se presentan los siguientes casos:

Cuando la muestra es sólida:

1. Se pesa 1 mg de la sustancia por analizar.
2. Se pesa de 100 - 200 mg de un halogenuro de álcali, ejemplo BrK.
3. Se trituran ambos juntos y luego se secan, para eliminar la humedad.
4. Se comprime a alta presión (25000 psi).
5. Se obtiene un pequeño disco de aproximadamente 10 mm de diámetro y de 1 - 2 mm de espesor.
6. Se coloca en el instrumento y se obtiene el registro correspondiente.

Cuando la muestra es líquida, se emplea Nujol, aceite o hexaclorobutadieno, los cuales tienen pocas bandas de absorción. Luego se hace una pasta que debe tener aproximadamente de 0.01 - 0.05 mm de espesor y debe dar la mayor transmitancia posible. Enseguida se registra en el instrumento.

Cuando la muestra es gaseosa: se mide aproximadamente en celdas de 10 cm de longitud. La celda se llena a través de una aguja hipodérmica. Se usa para determinar estructuras finas racionales.

En los análisis cuantitativos se usa una de las siguientes técnicas:

1. Método de línea base: se elige una banda de absorción de la muestra, la cual no debe caer demasiado próximo a las bandas de otros componentes de la matriz. El valor de la energía radiante incidente (Po) se obtiene dibujando una línea recta tangente a la curva de absorción espectral en la posición de la banda de absorción de la muestra. La transmitancia P se mide en el punto de máxima absorción (Fig. Nº 6), luego se grafica log (Po/P) vs. concentración (Fig. Nº 8).
2. Método de la proporción empírica: El valor de la energía radiante se obtiene tomando el máximo de absorción P y el mínimo de absorción Po (Fig. Nº 7), luego se hace el gráfico log (Po/P) vs. concentración (Fig. Nº 8).

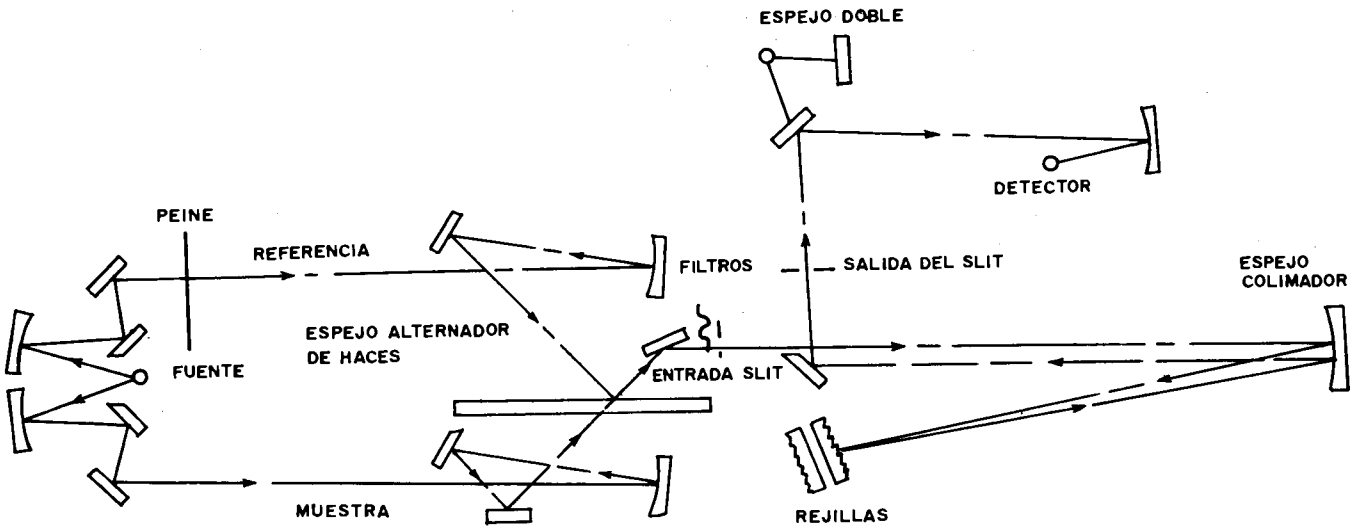


Fig. 5 ESQUEMA DEL CIRCUITO OPTICO DEL ESPECTROFOTOMETRO IR
(Tomado del Manual de métodos de investigación en el ambiente acuático)

Por convención las posiciones de las bandas son nombradas en unidades de número de onda ($\bar{\nu}$) el cual es expresado en recíproco de cm (cm^{-1}), usualmente mencionado como frecuencia de banda. Sin embargo la unidad real de frecuencia (ν) es dada en recíproco de segundo (seg^{-1}). Un término alternativo (λ), longitud de onda medida en micrones (μ) es usado también para indicar la posición de la banda. La relación de estas unidades se encuentra en las siguientes expresiones:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad ; \quad \nu = \frac{c}{\lambda}$$

Donde:

C = Velocidad de la luz

ν = Frecuencia

λ = Longitud de onda

$\bar{\nu}$ = Número de onda

Debido a que la absorción dada a una cierta longitud de onda (λ) es proporcional a la concentracion del grupo funcional, la ley de Lambert - Beers es válida.

5. APLICACIONES

El espectro IR es usado para determinaciones de muestras sólidas, líquidas y gaseosas o en solución.

Se usa en la investigación de varias maneras:

1. Para seguir el desarrollo de muchas reacciones químicas mediante el examen de muestras tratadas convenientemente.
2. En la identificación y estudio de la estructura molecular. Si el espectro no contiene la absorción típica de cierto grupo funcional la molécula no contiene dicho grupo.
3. En las identificaciones de compuestos en el agua de mar, los cuales son extraídos mediante técnicas adecuadas. Ejemplo: determinación de Carbón Orgánico disuelto y partículas de carbón en el agua de mar, usando el IR analizador automático 215 B.

La interpretación de los espectros requiere de una serie de factores los que dan una orientación y asignación a las diferentes bandas de las vibraciones de los átomos o grupos de átomos que forman la molécula. Las frecuencias de absorción de la molécula depende de tres características: los átomos que forman la molécula, la fuerza del enlace químico y la geometría espacial o distribución espacial de los átomos en la molécula (estructural). Estas características permiten diferenciar una especie de otra, además indican si los átomos son livianos o pesados. La frecuencia de los átomos livianos se realiza a frecuencia más altas (cortas) y los pesados a frecuencias más bajas (grandes).

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

Espectrofotómetro IR - 215 B

1. Se conecta el instrumento al circuito de la corriente. Se coloca "Power" en posición "ON" y se deja calentar por una hora.
2. Se regula "Sensibity" a 030 para el análisis de Carbón Orgánico disuelto y a 010 para el análisis de Partículas de Carbón.
3. Se regula la velocidad del flujo del gas transportador (O_2) a 200 ml/minuto.
4. Se coloca la ampolla conteniendo la muestra en el destructor de ampollas.

5. Se espera que el CO_2 atmosférico contaminante fluya del sistema (al cabo de ± 1 minuto aparecerá un pequeño pico).
6. Con la ayuda de un alicate de pinza se rompe el extremo de la ampolla y se empuja la cánula hacia abajo dentro de la solución.
7. El detector del espectrofotometro medira la intensidad de absorción, el cual es proporcional a la concentración.
8. Después que la ampolla es analizada se reemplaza rápidamente con otra ampolla.

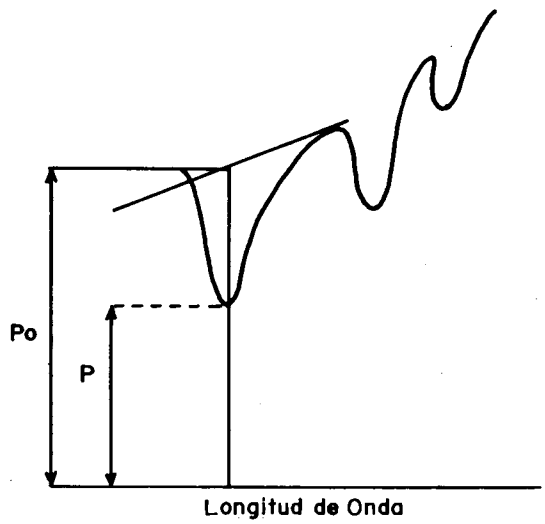


Fig. 6 ESQUEMA METODO DE LA LINEA BASE (Tomado del texto **Métodos Instrumentales de Análisis** por Willard-Merrit)

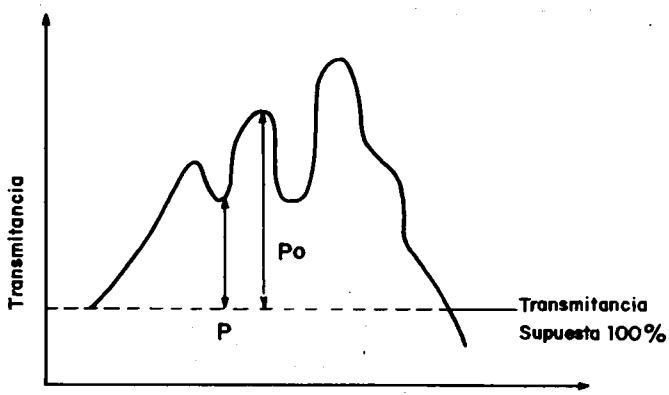


Fig. 7 ESQUEMA: METODO DE LA PROPORCION EMPIRICA (Tomado del texto Métodos Instrumentales de Análisis por Willard-Merrit)

ESTANDARIZACION

Hacer pasar una serie de muestras estándares de CO_2 con 800 ó 900 P.P.M. y EDTA, para construir curvas de trabajo que se utilizarán en la determinación de Carbón Orgánico disuelto y partícula de carbón respectivamente.

Con las lecturas de los estándares hacer un gráfico, área de pico versus concentración en µg C/lto o mgr C/lto.

Debido a las fluctuaciones en la línea de voltaje y a la dificultad de producir exactamente la continuidad de flujo de gas transportador, es necesario correr curvas estándares con cada corrida de muestra.

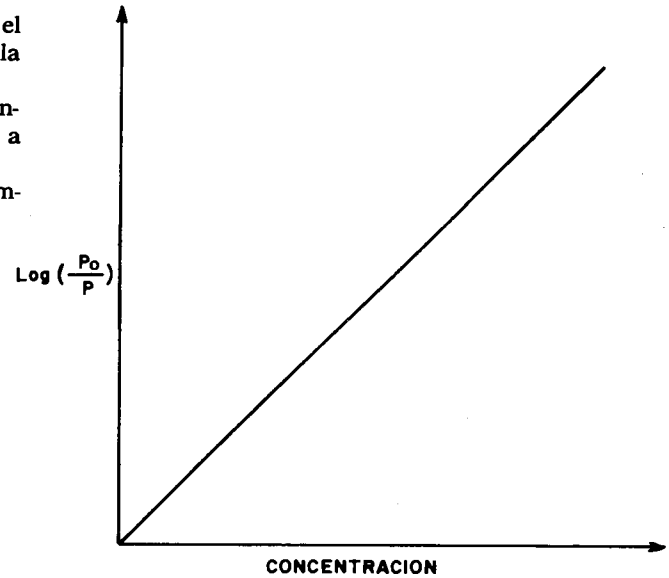


Fig. 8 Log $\left(\frac{Po}{P}\right)$ vs. CONCENTRACION

ANALISIS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

1. INTRODUCCION

La absorción atómica es un método usado en análisis cualitativos y cuantitativos, que permite la determinación de la mayoría de los elementos presentes en una muestra en solución. Es importante porque hace posible determinaciones de concentraciones muy bajas en el rango de trazas.

2. FUNDAMENTO

La absorción atómica se basa en la propiedad de los átomos que dice: "El átomo al estado libre sólo absorbe radiación electromagnética que es capaz de emitir". Esta absorción produce un diminución de la intensidad de la radiación emitida la cual es medida para darnos la concentración del metal en la muestra.

$$M^* \leftrightarrows h\nu + M^\circ$$

$h\nu$ = radiación emitida
M^* = metal excitado libre
M° = átomo libre
ν = frecuencia
h = constante de Planck

En la práctica los iones metálicos en solución son llevados al estado de vapor atómico mediante el uso de una fuente de energía, como por ejemplo, la llama aire-acetileno. En dicho estado absorbe fuertemente la radiación característica emitida por el mismo metal, mediante la lámpara de cátodo hueco del elemento a analizar. Esta absorción es proporcional a la concentración del elemento metálico.

3. INSTRUMENTAL

Las partes básicas de un instrumento de absorción atómica son: fuente de energía radiante, atomizador (quemador), sistema óptico (monocromador), detector y amplificador, y sistema de lectura (ver figura Nº 9).

1. La fuente de energía radiante es una lámpara de cátodo hueco que emite la radiación característica del elemento que se desea analizar.
2. El atomizador (quemador), sirve para vaporizar la muestra y llevar al estado atómico al metal que se quiere determinar, usando llama de alta temperatura.
3. El sistema óptico está formado por el monocromador que sirve para separar la longitud de onda del elemento a analizar.
4. El detector y amplificador es un sistema para la medida de la intensidad absorbida, la cual es multiplicada para ampliar la señal, lo que constituye el fotomultiplicador.
5. El sistema de lectura da los resultados de la intensidad medida, expresada en términos de absorción o directamente en concentración.

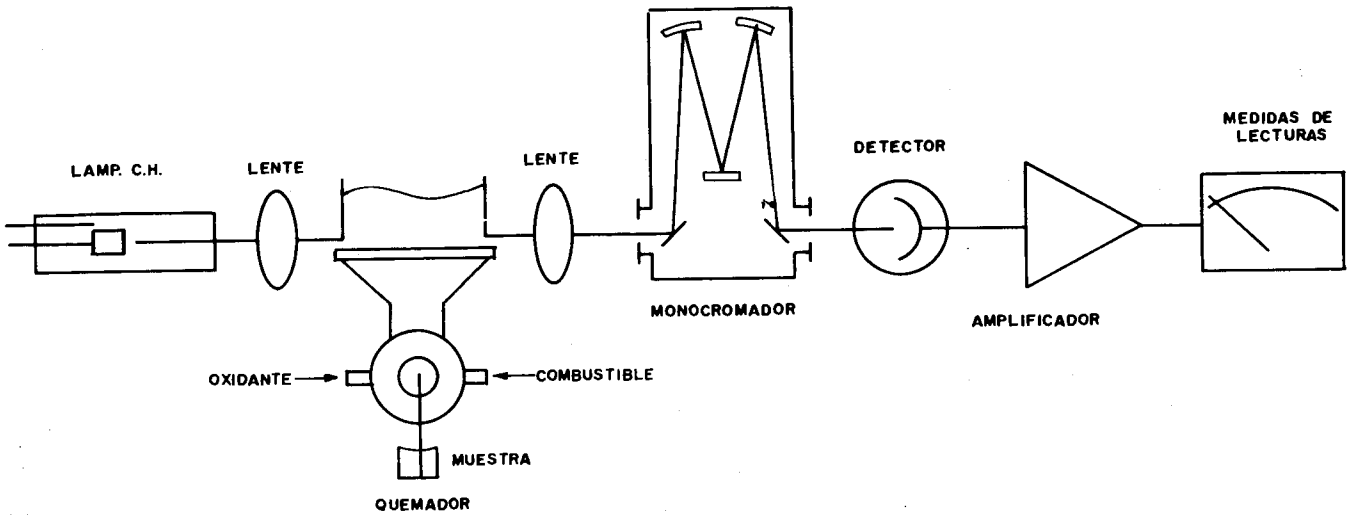


Fig. 9 DIAGRAMA DE LAS PARTES DEL ESPECTROFOTOMETRO DE ABSORCION ATOMICA

4. METODOLOGIA

En las determinaciones cuantitativas se usan dos técnicas:

1. La técnica de la curva de patrones, la cual consiste en preparar una serie de soluciones de concentraciones conocidas del elemento que se va a determinar, las cuales son preparados en las mismas condiciones que la muestra problema. Luego se mide en el instrumento el % de absorción correspondiente a cada muestra de concentración conocida y se transforma a absorbancia mediante el uso de tablas. Con estos datos se construye el gráfico absorbancia vs. concentración el cual es usado para el cálculo de la concentración de la muestra problema (Fig. Nº 10).
2. La técnica de adición, la cual se usa para eliminar la interferencia por masa o matriz, es decir, cuando no es posible reproducir en los estándares las condiciones de la muestra. Consiste en preparar por lo menos 4 soluciones que tengan la misma cantidad (C_x) de la muestra problema más una cantidad conocida de concentración del elemento que se va a analizar. La concentración de la muestra problema (C_x) se hallará según indica la (Fig. Nº 11).

5. APLICACIONES

Los análisis por absorcion atómica son usados tanto en la industria como en las diversas disciplinas de la ciencia (agricultura, medicina, minería, pesquería, etc.), debido a su gran exactitud y precisión, ya que es altamente específico y no presenta interferencia óptica. Además es más fácil obtener elementos al estado atómico que excitados en un 99%. Actualmente es posible la determinación de trazas de una concentración menor de 1 ppm, y se aplica a más de 50 elementos. Es un método común en los estudios de contaminación en el agua.

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

Espectrofotómetro de absorción atómica Jarrell Ash Dial-Atom II.

1. Se conecta el instrumento al circuito de corriente.
2. Colocar "POWER" en la posición "ON" y calentar por 30 minutos.
3. Se coloca la lámpara de cátodo hueco correspondiente al elemento que se va a analizar.
4. Se calibra la altura horizontal y vertical del quemador.
5. Llevar la intensidad de corriente de la lámpara al amperaje indicado (miliamperios) según el cátodo empleado.

6. Nivelar el haz emitido por la lámpara de cátodo hueco.
7. Abrir las llaves generales de los balones del aire y el acetileno y regular la velocidad del flujo del gas en el manómetro. Ejemplo: 30 Psi para el aire y 15 Psi para el acetileno.
8. Encender el quemador y seleccionar el "FUEL" y el "OXIDANT" hasta obtener una buena combustión con la ayuda de los botones de la escala numérica.
9. Se hace pasar agua destilada a través del nebulizador.
10. Seleccionar la línea de longuitud de onda de máxima absorción del elemento a analizar.
11. Calibrar el 0 % y 100% de absorción con los siguientes controles:
    —— Con el "ZERO" llevar a 100% de Abs.
    —— Con el "GAIN" „ „ 0% „ „
    —— El "DAMPING" puede estar en (1 ó 2).
12. Quitar el agua destilada y colocar la muestra a analizar.
13. Se lee el % de absorción de la muestra.
14. Según la técnica que se utilice hallar las concentraciones requeridas.

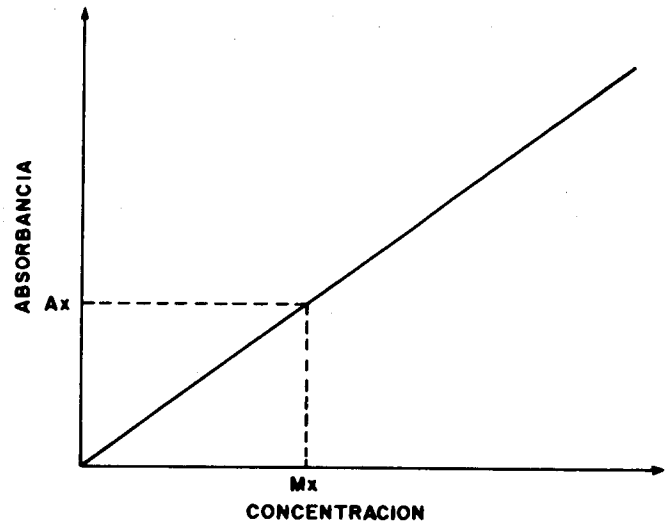


Fig. 10 TECNICA DE LA CURVA DE PATRONES

CONCEN-TRACION	% ABS.	ABSOR-BANCIA
X	—	—
X + 1	—	—
X + 2	—	—
X + 3	—	—

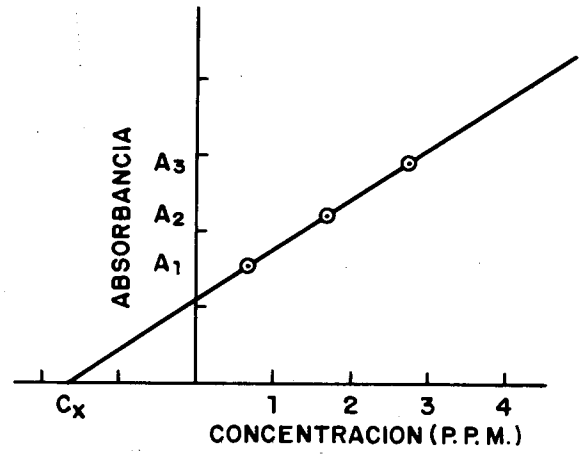


Fig. 11 TECNICA DE ADICION

ANALISIS DE NUTRIENTES CON EL AUTOANALIZADOR "TECNICON"

1. INTRODUCCION

El sistema del Autoanalizador permite realizar los análisis de aguas en el mismo lugar donde se extrae la muestra, con gran rapidez y seguridad, y es usado en una serie de análisis químicos y bioquímicos, a través de procesos de análisis de flujo continuo. Generalmente se canalizan de 50 a 120 muestras por hora.

El análisis es automático y las reacciones químicas se llevan a cabo en las corrientes contínuas segmentadas por aire. El flujo de la corriente (o de las corrientes) es llevado a través de tuberías plásticas de modulo a módulo, cada una de las cuales realiza una función diferente: muestreo de las muestras estándares y desconocidas, distribución de reactivos, purificación y filtración, calentamiento, detección y registro.

2. FUNDAMENTO

El Autoanalizador II se basa en los principios fundamentales de la colorimetría. Para la determinación de nutrientes en el agua de mar, las muestras son tratadas con reactivos que dan como resultado soluciones coloreadas, las cuales son medidas aplicando la ley de Lambert y Beer que relaciona la intensidad de la luz absorbida con la concentración de la muestra.

3. INSTRUMENTAL

El sistema Autoanalizador II consta de las siguientes partes:

1. Muestreador, el cual es un módulo que consiste de un plato receptor con capacidad para colocar 40 muestras.
2. Bomba de proporcionamiento y Múltiple Analítico, la cual proporciona flujo continuo, de acuerdo a los requerimientos del análisis.

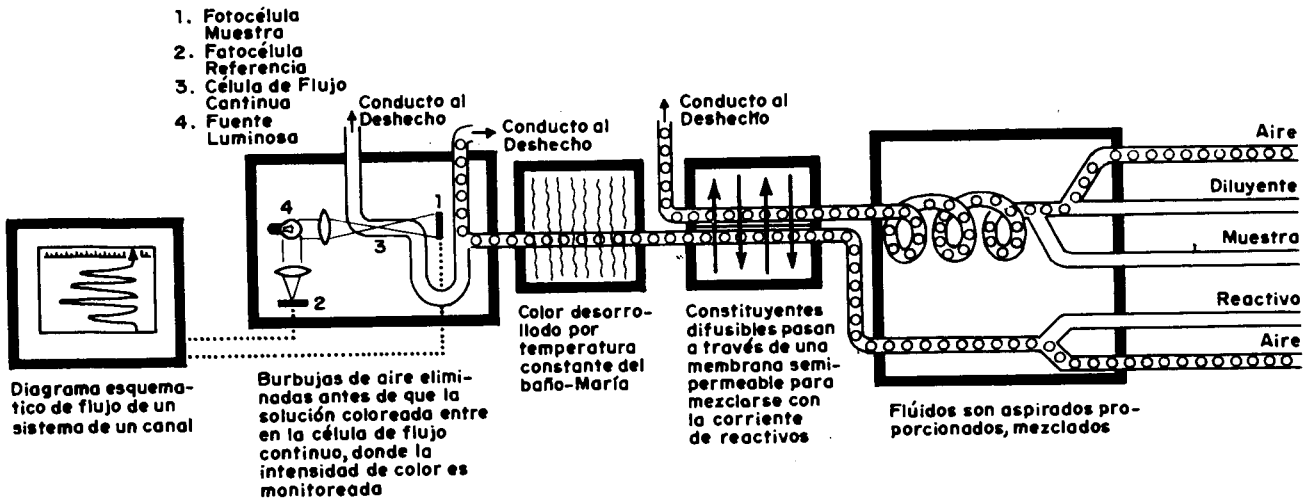


Fig. 12 DIAGRAMA DEL CIRCUITO INTERNO DEL AUTOANALIZADOR

3. "Manifold", en el cual la muestra y reactivos son mezclados, calentados, dializados y diluidos de acuerdo con los requerimientos del método. Cada tipo de análisis tiene su propio "Manifold".
4. Colorímetro, en donde la intensidad del color desarrollado es medido. Está provisto de filtros ópticos de tal manera que una banda estrecha de longitud de onda es usada para medir el nivel de la concentración del elemento o compuesto, en la muestra.
5. Aparato Registrador, en el cual aparece una serie de crestas en el gráfico del registrador, como resultado de la medición del colorímetro. Algunos aparatos disponen además de un impresor digital.

La operación del Autoanalizador es la siguiente: después que las cubetas conteniendo las muestras y los reactivos son colocados en el muestreador una bomba de proporcionamiento de canales múltiples, operando continuamente, la lleva una tras otra, junto con las corrientes de reactivos dentro del sistema. Las muestras y los reactivos ya mezclados en condiciones controladas, causan una reacción química dando como resultado una coloración. La intensidad del color desarrollado es medida mediante un colorímetro cuyo resultado es mostrado en una serie de crestas en el gráfico del registrador (ver Fig. Nº 12).

4. METODOLOGIA

Se usa estándares de concentraciones conocidas y luego se grafica concentracion vs. valores de la salida del impresor digital. La relación es lineal.

5. APLICACIONES

El sistema autoanalizador se usa:

1. En la oceanografía: instalado a bordo o en el laboratorio de tierra, en las determinaciones de fosfatos, silicatos, nitratos, nitritos, amonio, cobre, hierro, etc. Las ventajas son: (a) la rapidez de los análisis (40 muestras por hora); (b) la obtención de resultados inmediatos en el mismo lugar en donde se han extraído las muestras, permitiendo de esa forma una planificación oportuna segun los objetivos de la investigación, y (c) evita la descomposición de la muestra, ya que los analisis se realizan en el momento de su toma.
2. En estudios de contaminación: para determinar las áreas de contaminación y la concentración de algunos de sus contaminantes (cianuros, cromo, cobre, etc.).
3. En la industria farmaceútica: en el control de vitaminas, antibióticos, aminoácidos, enzimas, carbohidratos, etc.
4. En la industria pesquera: para los análisis de agua y proteínas en la harina de pescado.
5. En la agricultura; para la determinación de nitrógeno, nicotina, azúcares, aminoácidos, etc.
6. En fertilizantes y en la industria metalúrgica (en el control de níquel, fierro, cobalto, sulfatos, etc.).

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

1. Conectar el instrumento al circuito de corriente, chequear el papel del registrador, el impresor digital, el nivel del líquido de los reactivos, agua de lavado y depósito del desagüe.
2. Se coloca en el colorímetro los filtros y fototubos de acuerdo a la longuitud de onda seleccionada y chequear el dispositivo de reversión y las aperturas "A" y "B", las cuales deben estar completamente abiertas.
3. En el muestreador se coloca la leva adecuada a la velocidad de registro de la muestra (ejemplo: 40 muestras/horas).
4. Se enciende los módulos a excepción del muestreador y de la carta movible del registrador.

5. Empezar a bombear el agua colocando la plataforma sobre la bomba.

6. Chequear el calentamiento del baño de temperatura, si éste es requerido por el método y enseguida bombear los reactivos por quince minutos.

7. En el Impresor Digital poner "MODE" a "NORMAL", "RANGE" en 1000, "SAMPLING RATE" a la proporción que indica la leva del muestreador.

8. En el Colorímetro:

   a) Girar el interruptor rotatorio "ZERO" hasta obtener cero en el registrador, con la ayuda de un destornillador.
   b) Ajustar el control "ZERO" hasta que la medida de la concentracion indique 0000 en el Impresor Digital.
   c) Girar el interruptor rotatorio a "FULL SCALE" para obtener 100 en el Registrador, con la ayuda de un destornillador.
   d) Ajustar el control "CAL" hasta que la medida de la concentración indique 1000 en el impresor digital.
   e) Colocar el control "BASE LINE" en el punto medio.
   f) Colocar el interruptor rotario a "NORMAL" y ajustar la apertura como sea requerido para obtener cero en el registrador (una apertura debe permanecer abierta al límite).
   g) Ajustar "BASE LINE" para obtener 0000 en el impresor digital; se pone el interruptor rotario en la posición adecuada si es requerido.

9. Poner las copas en la bandeja de muestras y presionar "ON" en el muestreador para aspirar la primera muestra. Luego se para el muestreador por un minuto o un minuto y medio y nuevamente se activa el muestreador (las copas 1 y 2 deberán contener los estándares de máxima concentración que indica el método).

10. En el Impresor Digital:

    a) Seleccionar "RANGE" como sea necesario para la concentración de la primera copa, luego en el colorímetro se ajusta el control "STD CAL" para obtener el valor de ensayo en la medida de la concentración.
    b) Presionar el botón "START PRINT" cuando la concentración se hace constante y los números empiecen a decrecer.
    c) Observar la segunda muestra y ajustar el tiempo de Impresión como se requiera.
    d) Dejar correr las demás muestras. (La impresión es automática).

11. Terminado el análisis lavar con agua destilada el sistema por 15 minutos. Apagar todos los módulos, sacar la plataforma de la bomba y guardarlos en posición invertida.

ANALISIS POR FOTO-OXIDACION ULTRAVIOLETA

1. INTRODUCCION

La fotooxidación con radiación ultravioleta es un proceso físico-químico que es usado como una parte de la metodología en la determinación de ciertos compuestos que necesitan un tratamiento previo con una radiación de alta frecuencia, para lograr de este modo la liberación del compuesto que se desea determinar.

En los análisis espectrofotométricos algunas veces resulta mucho más conveniente la utilización de la fotooxidación con radiacion ultra-violeta que la utilización de una oxidación con agentes oxidantes tradicionales, ya que estos últimos muchas veces dan como productos, compuestos que desarrollan coloraciones que interfieren con el color del compuesto que se desea analizar.

2. FUNDAMENTO

El fundamento de este método se basa en el fenómeno físico-químico de oxidación-reducción. Este método de oxidación por radiación ultravioleta es usado principalmente para la oxidación de compuestos organometálicos y de compuestos organicos solubles de nitrógeno, fósforo y carbono, en los que posteriormente se va a realizar una determinación espectrofotométrica.

La exposición de agua oxigenada a una radiación ultravioleta de alta intensidad, cataliza la oxidación de todas las moléculas orgánicas que contienen en su estructura los elementos por analizar.

El único reactivo que se usa es el peróxido de hidrógeno, el cual desempeña un papel de coadyuvante en la oxidación y que luego se reduce dando un producto final de agua líquida que no interfiere el análisis.

1. OXIDACION DE COMPUESTOS ORGANICOS DE FOSFORO
   La exposición del agua de mar a irradiación ultravioleta libera los enlaces fósforo orgánico como ortofosfato inorgánico. La diferencia de concentración de fosfato entre muestras irradiada y no irradiada dara la medida de fósforo orgánico.

2. OXIDACION DEL CARBON EN MATERIA ORGANICA
   La oxidación total de la materia orgánica puede ser llevado a cabo por irradiación durante una hora en presencia de una o dos gotas de H_2O_2 al 30%. La reacción sigue una cinética de primer orden a una proporción constante de aproxima damente 0.05/min. Las investigaciones indican una producción cuantitativa de CO_2 como un producto final de este proceso.

3. OXIDACION DE COMPUESTOS ORGANICOS DE NITROGENO
   El ion amonio y materia nitrogenada soluble puede ser oxidada en presencia de oxígeno disuelto (una o dos gotas de H_2O_2) y de radiación ultravioleta para dar cuantitativamente iones, nitratos y nitritos.

3. INSTRUMENTAL

El equipo de foto-oxidación ultravioleta consta de dos módulos:

1. La fuente de radiación ultra-violeta, y
2. La fuente de suministro de poder.

1. **La lámpara de Mercurio:**

Es la fuente de radiación ultravioleta de gran intensidad, la cual produce los vapores metálicos (de Hg).
El funcionamiento de la lámpara se basa en el principio del "EFECTO TERMOIONICO", que consiste en el paso de la corriente eléctrica entre dos electrodos introducidos en una atmósfera de vapor de mercurio que produce inicialmente un calentamiento de los mismos, lo cual induce a la emisión termoiónica del filamento, de tal manera que cuando la corriente de calentamiento se corta y se aplica a través del tubo que los contiene, el voltaje total de la línea; produce una descarga entre los electrodos, que inicialmente es conducida por el gas inerte del tubo. A medida que el calor producido por la descarga vaporiza el mercurio, la radiación producida por el metal aumenta en intensidad y llega a sobrepasar a la del gas inerte que está contenido en la lámpara.
El tiempo necesario para evaporar todo el mercurio dentro de la lámpara y llevarlo a la presión de trabajo (entre una o dos atmósferas) es llamado "PERIODO DE CALENTAMIENTO" y requiere de cinco minutos, aproximadamente.

2. **Suministro de Poder:**

Es el módulo que se encarga de transformar la corriente de 220 voltios y 60 ciclos a la necesaria para el correcto funcionamiento de la lámpara y de los accesorios adicionales al instrumento.

4. METODOLOGIA

1. Llenar los tubos de cuarzo con la muestra (acuosa), dejar espacio suficiente para la expansión de la muestra por la temperatura.
2. Agregar una o dos gotas de H_2O_2 (30%) para tener exceso de O_2 disuelto, luego se inserta la tapa de vidrio esmerilada lentamente y se mezcla cuidadosamente. (No engrasar la tapa).
3. Colocar el tubo de muestra en la unidad de fotooxidación, usando el portador de muestra e irradiar por el tiempo necesario para el respectivo análisis.

5. APLICACIONES

1. En las determinaciones de fosforo, nitrogeno y carbón orgánico en el agua de mar.
2. En la descomposicion de compuestos órganometálicos.
3. Para proveer muestras libres de materia orgánica para cultivos y en análisis de nutrientes y vitaminas.

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

1. Se conecta el instrumento al circuito de corriente.
2. Se coloca el tubo de cuarzo conteniendo la muestra por analizar.
3. Colocar el interruptor de la fuente de poder en "ON" y dejar quince minutos.
4. Poner el interruptor selector en "AUTOMATICO".
5. Se selecciona el tiempo de exposición de la muestra de cero a seis horas, de acuerdo al análisis por realizar.
6. Después del tiempo de exposición, se coloca en en "OFF", dejando enfriar la lámpara (20-30 minutos) antes que el arco sea nuevamente encendido.

ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

1. INTRODUCCION

El análisis por cromatografía de gases es el más moderno de los métodos cromatográficos.

La cromatografía líquido-gas permite analizar mezclas gaseosas en forma rápida y exacta, debido a lo cual ha adquirido gran importancia y es usado en múltiples trabajos de rutina y de investigación.

2. FUNDAMENTO

La cromatografía de gases es un método físico de separación de los componentes de una mezcla, la cual depende de la diferencia de los coeficientes de distribución de los componentes entre una fase fija y una fase móvil:

$$K = \frac{\text{cantidad de fase fija}}{\text{cantidad de fase móvil}}$$

Donde:

K = coeficiente de distribución

En el análisis cromatograrico la muestra es volatilizada a una elevada temperatura. El gas transportador (usualmente N_2) lleva los componentes a la columna.

Todo componente tiene una solubilidad característica en el líquido y en el gas, los más solubles en el gas serán eluidos primero, y los solubles en el líquido vendrán después. Cuando los componentes pasan a la columna entran al detector, el cual da una respuesta eléctrica de los componentes registrándose los cromatogramas correspondientes.

El tiempo de inyección de la muestra a la aparición de un componente (pico) se llama tiempo de retención, el cual debe ser constante. De este modo el tiempo de retención es usado como una medida de identificación de los componentes.

3. PRINCIPIO INSTRUMENTAL

El cromatógrafo de gas (Fig. 13) consta de seis partes fundamentales:

Regulador de presión y medidor de flujo para el abastecimiento del gas portador, un sistema de inyección de la muestra, la columna de separación, el compartimiento térmico, el sistema de detección, un registrador de cinta gráfica o algún otro dispositivo indicador del rendimiento del detector.

1. La eficiencia de un cromatógrafo depende directamente del mantenimiento de la velocidad de flujo del gas transportador, el cual debe ser constante. Los contaminantes en el gas transportador pueden afectar el compartimiento de la columna, así como la respuesta del detector.

2. La inyección de la muestra debe hacerse según el estado en que se encuentren. Las muestras líquidas se inyectan con jeringas hipodérmicas, las muestras sólidas deben disolverse en líquidos volátiles y las muestras gaseosas se inyectan mediante jeringas especiales para gas o por una válvula de muestreo llamada divisora de corriente.

3. La columna cromatográfica juega un papel importante y por lo tanto se debe tener en cuenta el material de fabricacion: acero inoxidable, cobre, cupro-níquel, etc. Cuando son de vidrio ya sea en forma de U o en serpentín, las extensiones pueden ser de 120-150 cm, y cuanto más larga sea, la detección será mejor.

4. El compartimiento térmico encargado del control de la temperatura de la columna puede llevarse a diferentes velocidades hasta un máximo de 60° C/minuto en los márgenes de temperaturas bajas y alrededor de 35° C/minuto a temperaturas más elevadas.

5. Los detectores que son celdas de conductividad, registran el paso de los gases, tienen un volumen aproximado de 0.25 ml. Consta de una celda indicadora y otra de referencia, constituyendo las dos ramas del puente Wheatstone. Por la celda de referencia fluye el gas vehículo sólo y por la celda indicadora el gas vehículo más los componentes de la muestra.
Los detectores pueden ser: detectores de conductividad térmica, detectores de ionización, detectores por densidad de los gases y otros, siendo los más usados los de conductividad térmica, los que reciben el nombre de Caterómetros.

6. Registrador de la señal de la corriente, el cual es un instrumento independiente conectado al puente que amplifica y registra el desequilibrio de éste, trazando sobre un papel el cromatograma correspondiente.

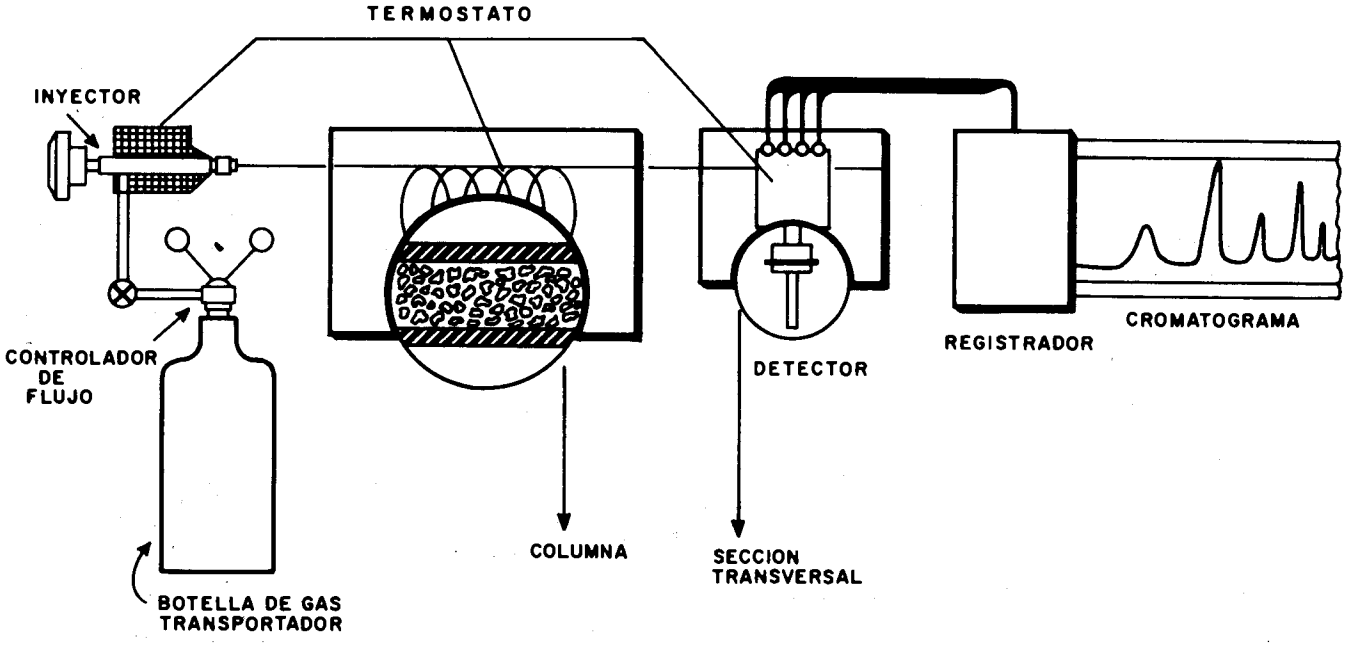


Fig. 13 ESQUEMA: DIAGRAMA DE LAS PARTES PRINCIPALES DE UN CROMATOGRAFO DE GASES (Tomado del texto basic Gas Chromatography by H. M. Mc Nair and E. J. Bonelli).

4. METODOLOGIA

La identificación y medida de los constituyentes (análisis cualitativo y cuantitativo) se realiza, generalmente, en columna de diámetro pequeño (aproximadamente 5 mm) y de 2 a 4 metros de largo, y con muestras que fluctúan de 1 ml a 0.01 ml si son líquidos y de 1 a 10 ml si son gaseosas.

En los análisis cualitativos, la identificación de un componente se debe principalmente a la acción separadora de la columna, en el cual el detector actúa sólo como informador. La columna separa los componentes de la muestra que emergen a distintos tiempos de retención o volúmenes de retención que se manifiestan en el eje de las abcisas del gráfico. Para la identificación, frecuentemente se compara el cromatograma obtenido con los de compuestos conocidos y puros. Cuando en una mezcla se sospecha que un componente ya identificado corresponda a un pico dado, se añade a la muestra problema una cantidad del componente puro y se procede a tomar su cromatograma. Si aparece un nuevo pico la predicción es errónea. Los datos de retención pueden obtenerse de la bibliografía o también por determinaciones experimentales usando compuestos puros.

En los análisis cuantitativos pueden aplicarse las siguientes técnicas:

a) Técnica del Estándar Interno:

Consiste en agregar una cantidad fija de una sustancia elegida como estandar interno a cantidades diversas de la sustancia problema, cuya identidad se conoce pero no la concentración. Para cada mezcla se obtiene un cromatograma y se miden los picos (ya sea en áreas o alturas). La altura de los picos tienen relación lineal con la concentración, cuando la forma de la banda es simétrica; ejemplo: cromatografía líquido-gas, en el que se grafica:

$$\frac{\text{altura del pico problema}}{\text{altura del pico estándar}} \text{ Vs. } \% \text{ Concentración de la muestra}$$

Luego se agrega la misma cantidad del estándar a la muestra problema y se traza su cromatograma bajo las mismas condiciones de flujo y temperatura que los estándares.
Luego se hace la relación de alturas de picos y se obtiene en el gráfico el porcentaje de la concentración de la muestra.

b) Método de Normalización Interna:

Se mide el área de cada pico ya sea por integración, midiendo con un planímetro o multiplicando la altura del pico por el ancho medio de la curva. Este ultimo procedimiento es inexacto en picos agudos donde el ancho es muy pequeño.
La suma de todas las áreas obtenidas de picos dan un área total que se considera el 100% en concentración. Por lo tanto la relación de un área de pico al total de área es como la relación de la concentración del constituyente a 100%.

5. APLICACIONES

Se aplica en los análisis cualitativos y cuantitativos de toda clase de compuestos orgánicos e inorgánicos, siempre que éstos sean convertibles a vapor. La limitación del método es el pun de ebullición de los componentes, a más de 250°C como máximo, aunque se están desarrollando equipos que permitan aplicar este margen y alcanzar temperatura de 400-500°C.

También se usa:

a) En la separación de los constituyentes de una mezcla.
b) En el estudio de equilibrio de fases.
c) En la determinación de entropías y energía libre de las soluciones.
d) En el estudio de las conductividades térmicas.
e) En el estudio del mecanismo de orientación dipolo-dipolo.
f) En el estudio de fuerzas de Vander-Waals, Debye y London.

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

El cromatógrafo de gases VARIAN AEROGRAPH es operado siguiendo los siguientes pasos:

1. Ajustar las velocidades de flujo del gas portador: hidrógeno y aire, de acuerdo al detector seleccionado (cuando se usa detectorse de ^{3}H y ^{63}Ni sólo es necesario gas portador).
2. Poner en "ON" el interruptor principal de energía del panel de control.
3. Llevar los controles de temperatura del detector e inyector a la temperatura deseada.
4. Poner en "ON" el módulo programador de temperatura y seleccionar la temperatura deseada del horno de la columna.
5. Poner el interruptor "COLUMN-OVEN" a la posición "OVEN FAN" (la lámpara sobre el interruptor debe encenderse).
6. Poner en "ON" el "Recorder" y seleccionar la velocidad deseada.
7. Llevar el módulo "ELECTROMETER" a los parámetros deseados con el detector seleccionado.
8. Verificar que todas las regiones térmicas estén a la temperatura seleccionada y luego inyectar la muestra problema al inyector apropiado.
9. En el cromatograma obtenido llevar los controles del módulo "ELECTROMETER" como sea requerido, y enseguida anotar los montajes de los controles en el cromatograma.

ANALISIS POR TRIFOSFATO DE ADENOSINA (A. T. P.)

1. INTRODUCCION

El trifosfato de adenosina (A.T.P.) es un indicador de la cantidad de materia viviente, aunque no se conoce a ciencia cierta su nautraleza. Es usado particularmente para estimar la biomasa microbial en el ambiente acuático, especialmente debajo de la zona eufótica, donde no hay otro indicador conveniente.

Es muy importante la determinación de A.T.P. en el estudio de muchos aspectos de reacciones de Bioluminiscencia y luminiscencia química.

2. FUNDAMENTO

Se basa en la determinación cuantitativa de concentraciones extremadamente bajas de A.T.P. en muestras biológicas microbianas de colonias acuáticas.

La determinación cuantitativa del A.T.P. por bioluminiscencia depende:

a) Del rayo luminoso de la enzima luciferasa, el cual es específico para el A.T.P.
b) De la velocidad de la reaccion, la cual es directamente proporcional a la concentración del A.T.P., asumiento que los otros reactantes están en exceso.
c) De la emisión de un fotón de luz para cada molécula de A.T.P., el cual es hidrolizado.

La reacción total es la siguiente:

$$\text{Luciferina (reducida)} + ATP + O_2 \xrightarrow[\text{Luciferiasa}]{Mg^{++}}$$

$$\text{Luciferina (oxidada)} + PP_i + A_MP + H_2O + h\,\nu$$

Cuando una muestra que contiene A.T.P. es inyectada en la preparación de la enzima, hay una llamita de luz en el rango de 560-580 mu de longuitud de onda. La intensidad de la luz decae en forma exponencial tal como se muestra en la fig. 14 en donde:

A = Tiempo de inyección de la muestra,
B = Período de decaimiento (15 segundos),
C = Final de un minuto de periodo de integración de luz.

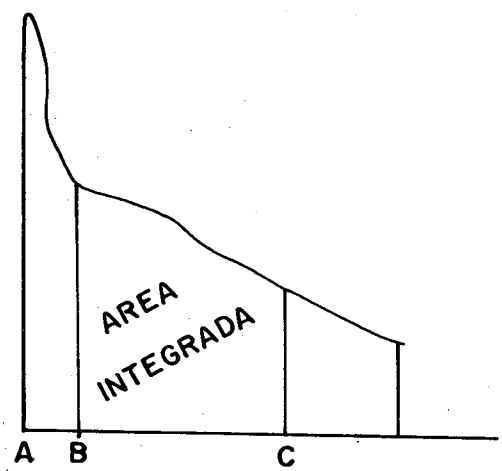


Fig. Nº 14

El área BC bajo la curva es proporcional a la cantidad de A.T.P. de la muestra.

3. PRINCIPIO INSTRUMENTAL

Una vez que la muestra es colocada en el portador de muestra, y adicionado el ATP, el "Slide dark" se enciende inmediatamente y el haz de luz generado choca al fotocátodo del fototubo, liberándose electrones, los cuales caen como lluvia a través del fotomultiplicador produciendo una corriente proporcional a la intensidad de la luz de la muestra, la cual es convertida y amplificada para producir un voltaje proporcional. (Fig. Nº 15). Luego este voltaje es alimentado hasta llegar al convertidor de frecuencia donde se produce el pulso del atenuador, cuya frecuencia es proporcional al voltaje impuesto, el cual es graficado con la ayuda de un cronómetro digital. La precisión del cronómetro sigue el pulso del atenuador pasando a un contador en donde es acumulado por un intervalo de tiempo prefijado. Al final de este intervalo la cuenta desplazada representa la integral:

$$\text{Cuenta desplazada:} = C \int_{t_1}^{t_2} I\mu . dt$$

Donde:

C = Es una constante determinada por una combinación del alto voltaje aplicado al fototubo y al atenuador, la sensibilidad del fototubo y la geometría óptica;
$I\mu$ = Es la intensidad de la luz emitida de la muestra;
t_1 = Tiempo inicial;
t_2 = Tiempo final del período de integración.

4. METODOLOGIA

La calibración del instrumento Fotómetro A.T.P. es hecha realizando pruebas con cantidades conocidas de A.T.P. El rango de aplicación es desde 10^{-9} mg A.T.P./ml a 1 mg A.T.P./ml.

El instrumento desplaza CPM para una muestra desconocida de A.T.P., el cual es comparado con una curva estándar para determinar la concentración absoluta de A.T.P. en la muestra. El tiempo de integración incorporado al fotómetro A.T.P. es estándar.

También es posible estimar la concentración de A.T.P. en una muestra midiendo la altura del pico de luz emitida, pero este valor depende de la rapidez de mezcla de la muestra y de la preparación de enzima, la cual es influenciada por su composición química.

La precisión del método indica que la integral está cerca de la exactitud.

5. APLICACIONES

La investigación precisa del A.T.P. tiene múltiples aplicaciones en el campo científico y se basa únicamente en la singularidad de moléculas de A.T.P., los cuales se encuentran en toda célula viva.

El A.T.P. se aplica en:

a) La determinación de Biomasa Microbial en el ambiente acuático;
b) La distribución de la biomasa en sedimentos;
c) En los estudios de polución: en el monitoraje de los efectos de las aguas de desechos y contaminantes en el ambiente marino. En la evaluación del total de la población microbial relativo al total de material orgánico en suspensión;
d) En los estudios metabólicos y de control del mecanismo celular;
e) Para diferenciar entre célula viva y célula muerta;
f) En los estudios de la cinética del crecimiento.

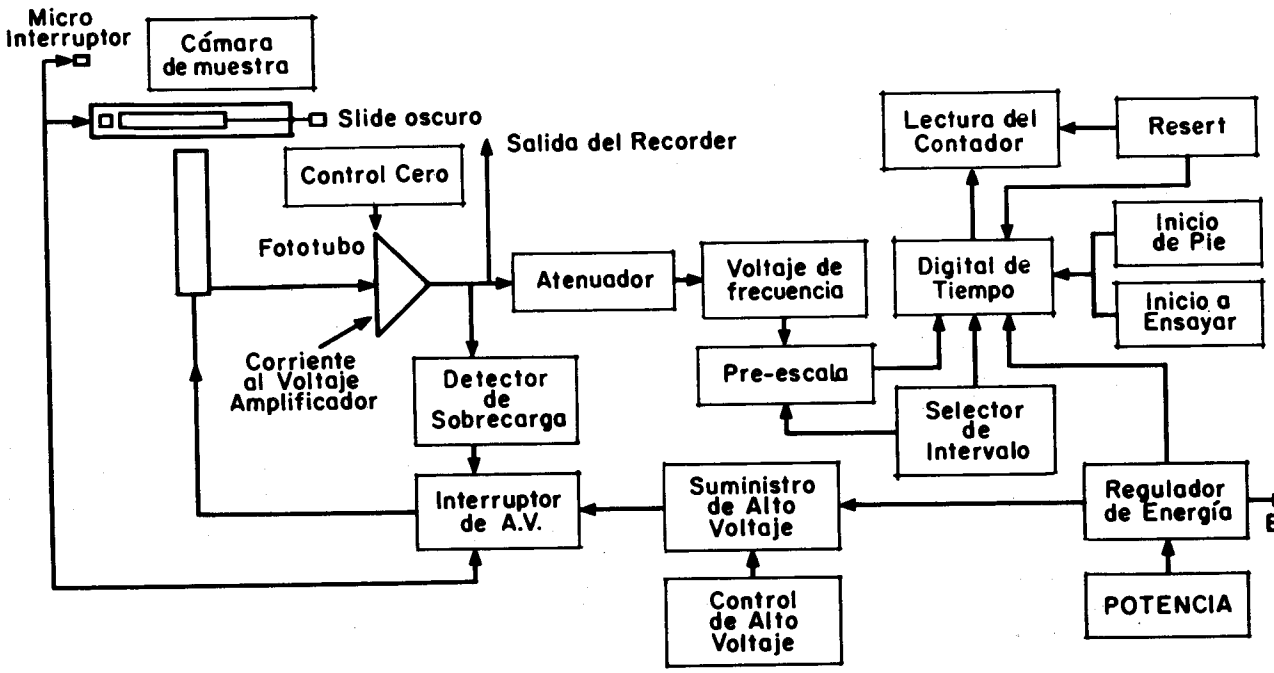


Fig. 15 ESQUEMA: DIAGRAMA DEL FOTOMETRO A. T. P. (Tomado del Manual de Instrucción Fotómetro A. T. P.)

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

Fotómetro JRB — A.T.P.

1. Se conecta el instrumento al circuito de corriente.
2. Se enciende el fotómetro JRB — A.T.P. presionando el botón (5) "ON-OFF". (Ver Figura Nº 16).
3. Se selecciona el tiempo de intervalo de 60 segundos, presionando el botón (4) "60 seg".
4. Se presiona el botón (3) "Resert".
5. Presionar el botón (2) "Start Assay" y observar la luz amarilla en este botón por 15 segundos.
6. Al final de los 15 seg. el color del botón (3) cambiará a verde y el período integral de los 60 seg. empezará.
7. Al final de este período el botón (3) "Resert SC" se iluminará indicando el fin de la integración.
8. Para otra muestra se repiten los pasos del 3 al 7.

ANALISIS POR FLUORESCENCIA

1. INTRODUCCION

El término fluorescencia fue introducido por Stokes (1952) y proviene del mineral fluorescente espato de fluor (F_2 Ca). Su aplicación a la química analítica se debe al desarrollo de los fluorómetros, los cuales son aparatos equipados con fototubos o células fotoeléctricas para la medida de las intensidades de fluorescencia.

Muchos compuestos químicos tienen la pro de fluorescer, es decir, absorber radiaciones de tud de onda corta para luego emitir radiacio longitudes de onda más larga. Bajo ciertas cc nes una intensidad de fluorescencia puede rela se fácilmente con su concentración.

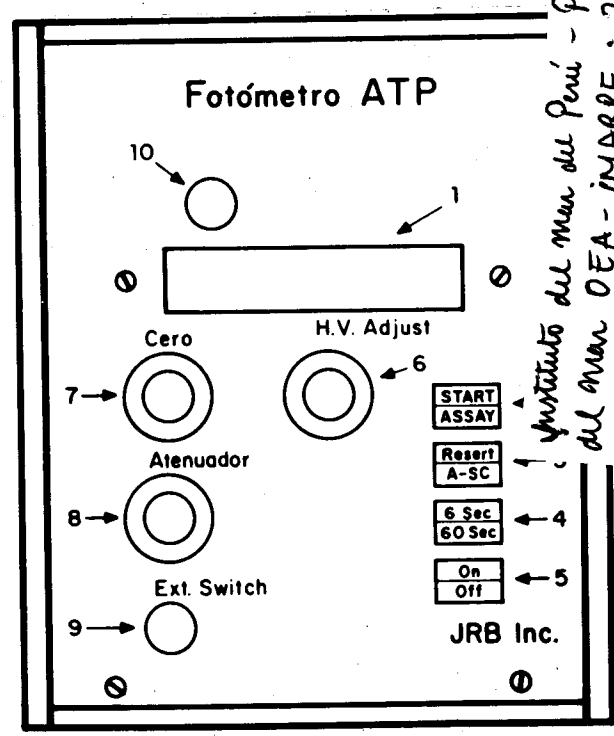


Fig. 16 ESQUEMA DEL INSTRUMENTO FOTOMETRO A. T. P. (Tomado del Manual de Instrucción Fotómetro A. T. P.)

Instituto del Mar del Perú - Proyecto Multinacional de Ciencias del Mar OEA - IMARPE : 37 Duplex

El interés analítico se debe a la extrema sensibilidad que puede obtenerse en la fluorometría cuantitativa. Sólo en raras ocasiones se aplica a los análisis cualitativos, ya que los espectros fluorescentes son muy inferiores a los de absorción.

Existen grupos de compuestos que presentan la propiedad denominada Fotoluminiscencia, es decir, que cuando son expuestos a la acción de ciertas radiaciones absorben longitudes de onda comprendidas entre determinados valores que son fijos para cada elemento y se denominan radiaciones excitantes, que luego devuelven en idéntica forma una longitud de onda mayor.

Hay dos grupos fotoluminiscentes, que se distinguen por el tiempo de vida. La fosforescencia, la cual varía de 10^{-4} a 10 seg. o más de vida media, y la fluorescencia que varía de 10^{-4} a 10^{-8} seg. La radiación emitida por los cuerpos fotoluminiscentes puede cuantificarse, siendo directamente proporcional con su concentración.

2. FUNDAMENTO

La fluorometría es la medida y uso de la fluorescencia. El fenómeno de fluorescencia es medido en el instante de emisión de luz de un átomo o molécula, que han absorbido luz. En este período de 10^{-8} segundos antes que ocurra la emisión, se pierde energía, emitiendo luz (luz fluorescente) de longitud de onda más larga que la absorbida (luz excitante).

La fluorescencia se basa en:

a) La excitación de elementos químicos a un nivel electrónico superior, mediante la radiación electromagnética.
b) La pérdida de parte de la energía suplementaria por medio de colisiones.

3. PRINCIPIO INSTRUMENTAL

Los principios fundamentales de la medida de fluorescencia son ilustrados en la Fig. Nº 17.

La longitud de onda apropiada de la luz excitante es dada por un filtro llamado filtro primario que se encuentra entre la fuente de luz y la muestra. La longitud de onda de la luz a ser medida es seleccionada por un filtro óptico secundario, llamado filtro secundario, que se encuentra entre la muestra y el fotodetector. La producción total del fotodetector es proporcional a la intensidad de luz fluorescente, la cual es amplificada para dar una lectura en el medidor o registrador. En un espectrofluorómetro los filtros son reemplazados por varios monocromadores y se obtiene el registro desplazando la longitud de onda, así como también la fluorescencia.

4. METODOLOGIA

La magnitud de la fluorescencia total depende de los grupos fluoróforos en la solución y es la base del uso cuantitativo de las mediciones fluorescentes.

La ley de Beer establece que en una solución de una sustancia absorbente, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración. En los análisis fluorométricos de soluciones diluidas, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración. Sin embargo, cuando se aumenta la concentración, la forma del gráfico Intensidad de fluorescencia vs. Concentración, es asintótica, debido a que la luz excitante no se distribuye uniformemente en la solución.

Los factores que influyen en los análisis son: la concentración de la sustancia fluorescente, la longitud de onda de la radiación excitante, el pH de la muestra, la temperatura, la presencia de ciertos iones que pueden actuar como inhibidores de la fluorescencia, la presencia de otras sustancias fluorescentes, etc.

5. APLICACIONES

Los análisis por fluorescencia se aplican principalmente en:

a) En la determinación de iones metálicos después de volverlos complejos con reactivos orgánicos; ejemplo: el complejo de aluminio con alizarina, el complejo de Zinc con 8 hidroxiquinolina.

b) En la determinación de clorofila "a" en aguas.

c) En la determinación de vitaminas B_1, B_2 y otros de interés bioquímico.

d) En la determinación de fenoles, aminas aromáticas, compuestos policíclicos polienos conjugados, esteroides, tocoferoles, ácido desoxirribonucleico, alcaloides, reserpina y derivados, estrógenos, flavinas, etc.

e) En la determinación cualitativa y cuantitativa de sustancias que tienen fluorescencia propia (ejemplo: riboflavina), y sustancias que no son fluorescentes pero que mediante un tratamiento con reactivos especiales dan fluorescencia ejemplo: clorhidrato de tiamina, el cual es oxidado a tiocromo, etc.

DETERMINACION POR SISTEMA DE CENTELLEO LIQUIDO

1. INTRODUCCION

La radiactividad es la radiación emitida en la desintegración espontánea de ciertos núcleos atómicos.

Los núcleos contienen dos tipos fundamentales de partículas pesadas; protones y neutrones.

La desintegración de un núcleo puede realizarse de distintas formas tales como: emisión de partículas alfa, beta y gama.

Las partículas alfa son núcleos de átomos de helio y constan de dos protones y dos neutrones. Cuando un núclido emite una partícula alfa, el núclido resultante tiene un número de masa 4 unidades inferior y un número atómico 2 unidades inferior:

$$^{A}_{Z}X \longrightarrow {}^{4}_{2}He + {}^{A-4}_{Z-2}Y$$

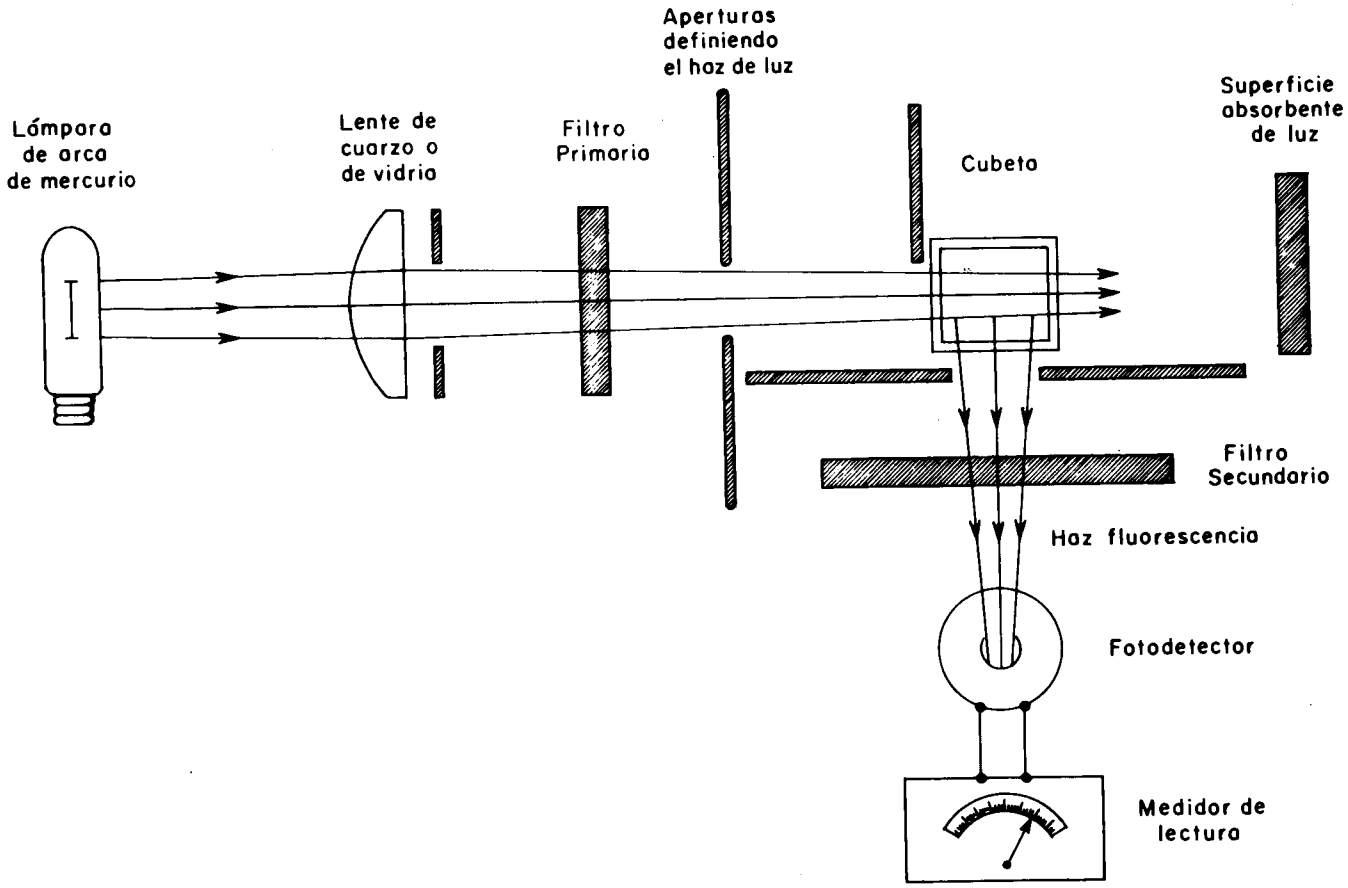


Fig. 17 DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LOS COMPONENTES OPTICOS DE FLUOROMETRO

Donde:

A = Peso atómico
Z = Número atómico
X = Isótopos

Esta forma de desintegración es frecuente en núclidos pesados ($Z > 83$). Las partículas alfa emitidas por los radioisótopos son siempre monoenergéticas.

Las partículas beta tienen una masa igual a la del electrón. Su carga eléctrica puede ser de una unidad elemental negativa (negatrón) o positiva (positrón). La emisión de partículas beta negativas se presenta en núclidos que tienen mayor número de neutrones que los núclidos estables del mismo elemento. Este exceso de neutrones desaparece por transmutaciones del tipo, los rayos gama no tienen masa ni cargas eléctricas, son fotones o cuantos de energía del mismo tipo de los rayos X, rayos ultravioleta, etc. Por el contrario, la emisión de positrones se presenta en núclidos con menor número de neutrones que los núclidos estables del mismo elemento.

$$N \longrightarrow P^+ + \beta^+$$

Donde:

n = neutrón
p+ = protón
β+ = beta

2. FUNDAMENTO

Se basa en el centelleo el cual es un sistema ternario compuesto de disolventes: soluto primario y soluto secundario. Ambos solutos actúan convirtiendo la radiación incidente en cuantos de luz.

Los solutos primarios típicos más usados son: p — trifenilo y 2 - 5 difenil exazol.

El soluto secundario más usado es: 1, 4 (2 — 5 fenil exazolil) benceno o "POPOP".

Los procesos que tienen lugar en el centellador líquido puede expresarse así:

S + radiación $\rightarrow S^*$ (S = molécula disolvente indica estado excitado)

$S^* + S_1 \rightarrow S + S_1^*$ (S_1 = soluto primario)

$S^*_1 + S_2 \rightarrow S_1 + S^*_2$ (S_2 = soluto secundario)

$S^*_2 \rightarrow h\nu + S_2$ (ν = frecuencia del fotón de luz).

Los emisores β débiles (C^{14} y H^3) se cuentan con gran eficiencia disolviendo la muestra en la solución centilliadora.

3. PRINCIPIO INSTRUMENTAL

Se basa en los detectores de centelleo con fósforo líquido y son usados para la medida de los isótopos de H^3 y C^{14}, cuya sensibilidad depende del detector usado.

El detector consta de un cristal de NaI (yoduro de sodio) en talio o de un elemento sensible que puede ser orgánico, plástico o líquido (Ejm.: el PT + POPOP en tolueno) y va acoplado ópticamente a un tubo fotomultiplicador.

Cuando un rayo (β, γ) incide sobre el cristal el elemento sensible produce en este un destello luminoso por excitación de los átomos de su red cristalina. Este destello luminoso es detectado por el fotocátodo del tubo fotomultiplicador, liberándose un determinado número de electrones (efecto similar al de la célula fotoeléctrica), los cuales se dirigen con elevada velocidad hacia el primer dínodo donde libera un haz de electrones de mayor intensidad que el incidente, luego este haz se dirige hacia el segundo dínodo, donde se produce un efecto similar al anterior. (Ver figura Nº 18).

El proceso de multiplicación del haz de electrones se repite en los diferentes dínodos, dando como resultado que el ánodo colector llega a tener un haz muy intenso de estas partículas, los cuales pasan a través de la resistencia R originando una caída de tensión igual IR, dando lugar a un impulso eléctrico que se registra en el equipo electrónico respectivo.

DESCRIPCION DEL INSTRUMENTO LS - 100 C. LIQUID SCINTILLATION SYSTEM

El sistema de centelleo líquido Beckman LS - 100 C. es un espectrómetro Beta que ofrece alto rendimiento analítico a temperatura ambiente (15º - 40º C) con capacidad para 100 muestras y para tres canales, mediante una torre de comando para programar el conteo en serie.

Tiene una computación electrónica completa e imprime los conteos por minutos (CPM) y control estadístico 2 σ (sigma) de los tres canales de datos de muestras.

La calibración automática de "quench" en los sistemas Beckman es ejecutado por el método combinado de la relación de estándar externo.

Los tubos fotomultiplicadores son suficientemente sensitivos, no requieren de un desviador secundario de haz. Usa PPO como fluor centellador en la solución de tolueno para desviar la longitud de onda de un isótopo radiactivo.

Los fotomultiplicadores Beckman Rca-tubos trabajan a la temperatura del ambiente (15º - 40ºC) como si fueran refrigerados, entonces se eliminan los componentes anticongeladores de "quenching" (metanol y etanol).

4. METODOLOGIA

Para determinar el conteo (C P M) en una muestra que contiene isótopos radiactivos, se construye una curva estándar de la muestra. Los estándares se preparan con alícuotas de una solución concentrada que contiene el isótopo a medirse.

Estos estándares dan un conteo progresivo, cuyos resultados, son expresados en porcentaje de eficiencia y son ploteados en un gráfico versus la relación del estándar externo (Fig. 18) del isótopo usado.

La relación del estándar externo debe hallarse entre 1.0 y 20.00 (en 1.00 se represtan el conteo máximo y en 20.00 no habrá conteo (Fig. 18).

Cuando una muestra es contada el instrumento no dará la relación del estándar externo, el cual se proyectará en la curva obtenida anteriormente y se obtendrá el % de eficiencia correspondiente.

La desintegración real por minuto se calcula en la siguiente forma:

$$\text{D.P.M.} = \frac{\text{C.P.M.}}{\text{Porcentaje de eficiencia}}$$

Donde: D.P.M. = Desintegración real por minuto
C.P.M. = Cuentas por minuto

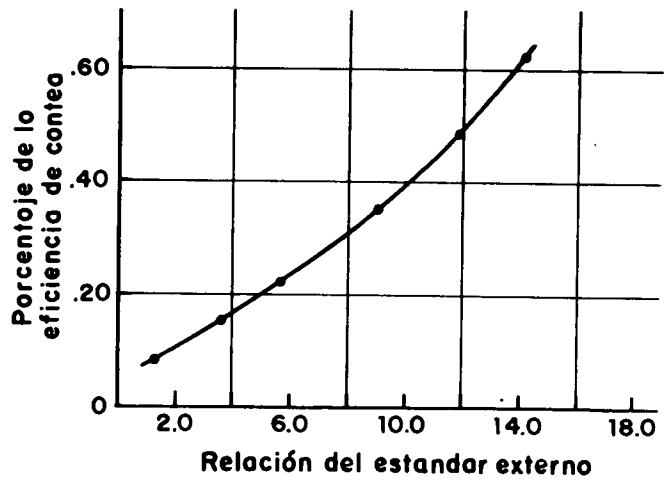


Fig. 18 CONSTRUCCION DE UNA CURVA DE CONTEO DEL TRITIO (Tomado de Manual Liquid Scintillation System Mod. LS-100c)

5. APLICACIONES

5.1. En los estudios de contaminación de aguas.
5.2. En la determinación de hidrógeno (tritio) en compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, proteínas, enzimas, esteroides, vitaminas, etc.
5.3. En los estudios de produccion primaria en aguas usando la técnica de carbono catorce.
5.4. En la determinación de tritio, carbono-14 y fósforo-32, en materiales orgánicos e inorgánicos.

6. MANEJO DEL INSTRUMENTO

El instrumento LIQUID SCINTILLATION SYSTEM BECKMAN LS - 100 C. es operado de la siguiente manera:

6.1. Se colocan las muestras que contiene el isótopo por analizar en la cadena portadora del instrumento.

6.2. Se gradúa el control "GAIN" del "External Standard" de acuerdo al isótopo a determinar.
6.3. Se selecciona el control "Preset Error" de acuerdo a la tabla equivalente de conteo para cada muestra (ver catálogo).
6.4. Se selecciona la velocidad de conteo de las muestras con el dial "Preset Min". Ejemplo 0.1 minuto/muestra.
6.5. Se coloca "Low Sample Reject" (CPM) en "OFF".
6.6. Se coloca el botón "Power" en posición "ON".
6.7. Se presiona el botón rojo o verde o azul de acuerdo al isótopo seleccionado (tritio, carbono-14 ó fósforo-32).
6.8. Se selecciona la forma de conteo ya sea en manual o automático.
(a) En forma manual: se gira el botón de "Manual" a "Sample Repeat", inmediatamente se encenderá las flechas del ascensor indicando la posición de la muestra [→] [↑] [↓] y se presionará los botones del (ascenso, trayecto o descenso de la muestra) hasta obtener los resultados en la carta del instrumento.
(b) En forma automática: se gira el botón de "Manual" hasta "Cycle Repeat" y los resultados aparecerán en la carta del instrumento.
6.9. En el registrador aparecerán los datos de desviación estándar, cuentas por minuto, % de error 2 σ y el número de la muestra correspondiente.

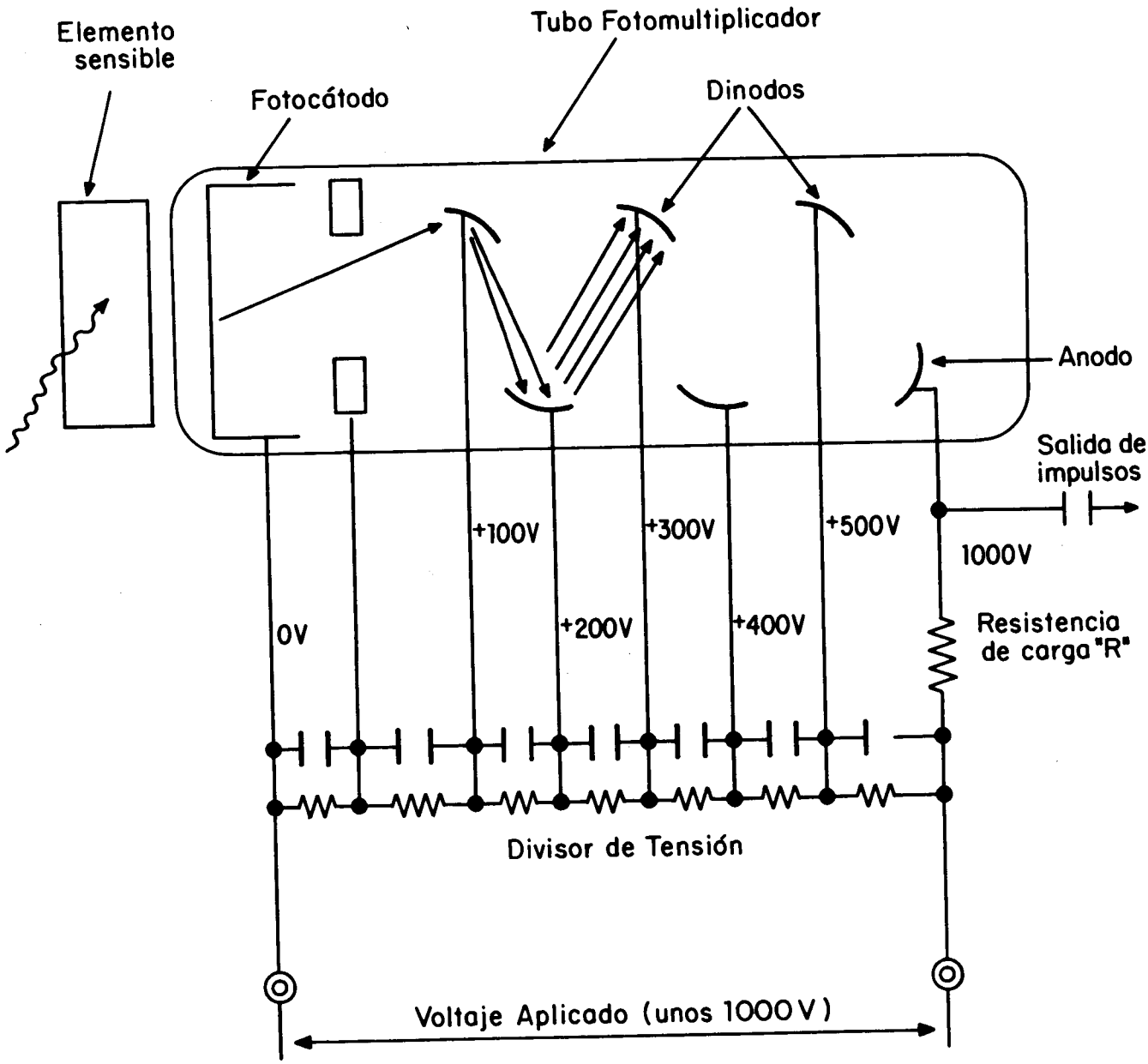


Fig. 19 ESQUEMA DE UN DETECTOR DE CENTELLEO (Tomado de Laad C y Lee Práctica de Radioquímica)

II. — DETERMINACION DE LA MATERIA ORGANICA
Análisis de materia orgánica soluble

DETERMINACION DE CARBON ORGANICO

Los métodos para la determinación de carbón orgánico disuelto en el agua de mar están basados generalmente en la oxidación húmeda y han sido descritos por: Koringa y Postma (1957), Gillbricht (1957), Duursma (1961), Wilson (1961) y Menzel y Vaccaro (1964), siendo los últimos los más satisfactorios. Sin embargo, Van Hall et al. (1963) recomiendan la combustión directa, debido a que los compuestos orgánicos varían en su sensibilidad a la oxidación. Armstrong, Williams y Strickland (1966) han usado el método de oxidación ultravioleta. El método descrito a continuación es el de Menzel y Vaccaro (1964) con algunas modificaciones.

1. FUNDAMENTO

Las muestras de agua de mar son purificadas mediante acidificación y burbujeo con nitrógeno antes de ser analizadas.

El carbón orgánico disuelto en agua de mar, es determinado como anhidrido carbónico debido a la intensa oxidación del persulfato de potasio sobre la materia orgánica, según la siguiente reacción iónica:

$$C_2O_4^{=} + S_2O_8^{=} \rightarrow 2\,SO_4^{=} + 2\,CO_2\uparrow$$

Luego el anhidrido carbónico resultante es determinado en un espectrofotómetro infrarrojo, el cual registra las áreas de las muestras analizadas las que son proporcionales a la concentración del carbon orgánico disuelto en el agua de mar.

Las muestras de agua no filtrada son usadas para determinar Carbón Orgánico Total, y las muestras filtradas para carbón orgánico disuelto.

2. EQUIPOS Y APARATOS ESPECIALES

2.1. Ampollas de vidrio de 10 ml.
2.2. Jeringas hipodérmicas de 10 y 50 ml.
2.3. Jeringa hipodérmica tipo tuberculina de 1.0 ml.
2.4. Micro-cuchara (espátula) de 130 mg de capacidad.
2.5. Micro-embudo de vidrio, apropiado para la abertura de la ampolla de 10 ml para introducir el persulfato.
2.6. Analizador infrarrojo BECKMAN I.R. modelo 215-B.

3. TOMA DE MUESTRA Y SU PROCESAMIENTO

Las muestras de agua de mar deberán ser tomadas inmediatamente que las botellas Van Dorn estén a bordo; luego se procederá como sigue:

3.1. Se filtra la muestra usando filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C).
3.2. Se toma 50 ml del filtrado en una botella de vidrio.
3.3. Se añade a la muestra 0.1 ml de ácido fosfórico concentrado y se hace burbujear nitrógeno puro a una velocidad de 200 ml/minuto durante un período de 5 minutos.
3.4. Se mide por triplicado 5.0 ml de la muestra con una jeringa hipodérmica y se colocan dentro de las ampollas preparadas. Luego se adiciona a cada una 130 mg de $K_2S_2O_8$ con la ayuda de una micro-espátula y un micro-embudo.
3.5. Se coloca un tubo de silicona y se cubre con grasa silicona en el extremo final. Luego se inserta la cánula a través del tubo de silicona bajándola hasta el contacto con el líquido.
3.6. La solución contenida en la ampolla es burbujeada con N_2 por 15 segundos, en seguida se saca la cánula y se sella la ampolla inmediatamente.
3.7. Las ampolla son autoclavadas a 120°C y 15 psi. durante una hora y guardadas a la temperatura ambiental hasta su análisis.

4. REACTIVOS ESPECIALES

4.1. Cilindros de CO_2 y O_2 con válvula de reducción y manómetro.
4.2. Carbón activado.
4.3. Persulfato de potasio.
4.4. Ascarita (asbesto en hidróxido de sodio).
4.5. Anhidrona (perclorato de magnesio).
4.6. Agua destilada libre de carbón orgánico. Esta se obtiene por destilación de una mezcla de un litro de agua destilada, 10 gr de pesulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y 1.0 ml de ácido fosfórico concentrado. Los primeros 100 ml se eliminan, el resto se guarda en una botella de vidrio. Esta agua no deberá contener más de 0.2 mg C/litro.
4.7. Acido fosfórico concentrado.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Se coloca la ampolla en el destructor de ampollas y se espera hasta que fluya el contaminante atmosférico, el cual aparecerá en el registrador como un pequeño pico de CO_2.
5.2. Con la ayuda de un alicate se rompe el extremo superior de la ampolla y se introduce rápidamente la cánula hasta hacer contacto con la solución, el gas transportador pasa a través de la Anhidrona (para extraer el agua), luego entra al analizador infrarrojo Beckman IR 215-B, el cual registra picos que luego son integrados con un registrador integrador Beckman o con la ayuda de un planímetro.
5.3. Después que la ampolla es analizada se reemplazará rápidamente con otra ampolla.

6. DETERMINACION DEL BLANCO

El blanco es difícil de determinar por que es imposible obtener agua completamente libre de carbón. Para determinar el blanco se procede de la misma manera que las muestras de agua de mar: se hacen determinaciones duplicadas de 1.0 ml, 2.0 ml y 5.0 ml, los

cuales tienen bajo contenido de carbón (por ejemplo: una muestra tomada debajo de 500 mts). Luego se convierte los picos de CO_2 obtenidos en el registro a áreas y luego a mg C/litros con la ayuda de la curva de calibración. Luego se plotea estas concentraciones de carbón versus el número de mls se muestra y se determina la concentración para un volumen cero. Esta cantidad debe estar entre 0.15 y 0.3 mg C/litro y será determinada cada vez que se use H_3PO_4 o persulfato nuevo.

7. ESTANDARIZACION O CALIBRACION

Debido a fluctuaciones en la línea de voltaje y a la dificultad en reproducir exactamente la velocidad de flujo del gas trasportador, es necesario construir una curva estándar con cada grupo de muestras. La estandarización se hace con muestras gaseosas de CO_2 como gas estándar de concentración conocida. Si la concentración del CO_2 no se conoce exactamente una estandarización correcta es imposible.

Procedimiento

7.1. Con una jeringa hipodérmica se toma diferentes volúmenes de gas como por ejemplo: 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, del balón de CO_2 de concentración conocida (800 ó 900 p.p.m.).
7.2. Se inyecta cada uno de estos volúmenes de CO_2 al analizador IR.
7.3. Se registra los picos de CO_2 de cada una de las concentraciones de gas.
7.4. Se determinará el área de cada uno de los picos de CO_2 con un planímetro o disco integrador.
7.5. Luego se grafica en el papel milimetrado Area vs. Concentración del CO_2.

8. CALCULOS

Si la concentración del balón de CO_2 es de 800 p.p.m. se determina los µg de carbono por cada mililitro de CO_2, ejemplo:

1 ml.	=	0.429 µgC
4 ml.	=	1.72 µgC
6 ml.	=	2.57 µgC
10 ml.	=	4.29 µgC
20 ml.	=	8.58 µgC
30 ml.	=	12.87 µgC
40 ml.	=	17.20 µgC
50 ml.	=	21,54 µgC

— Se calcula el factor de correlación que debe ser alrededor de 0.99, la pendiente y el parámetro "b".

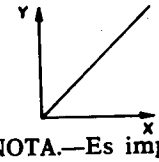
— La recta es de: $y = mx + b$ se despeja x de la curva

$$x = \frac{y - b}{m}$$

donde:

y = ordenada de la curva
b = parámetro de la curva
m = pendiente de la curva

— Luego se calcula la concentración "x" en µg C/l.
— Cuando no se cuenta con un programa para abreviar los cálculos de estandarización, se puede determinar gráficamente como sigue:



y = áreas de la muestra
x = concentración de la muestra.

NOTA.—Es importante empujar rápidamente la cánula dentro de la ampolla; si esto no es hecho, resultaría un doble pico. Si la cánula es rápidamente introducida en la ampolla y no aparece un pico, la ampolla ha sido quebrada abajo del cuello y hay fuga del gas.

DETERMINACION DE FOSFORO ORGANICO

El método descrito a continuación es el de Armstrong et al. (1966), basado en la exposición del agua oxigenada a una alta intensidad de radiación de longitud de onda menor de 2,500°A, catalizando la oxidación de todas las moléculas orgánicas conteniendo enlaces fosfato-ester o ácido fosfórico, liberándose todo el fósforo como ortofosfato.

1. FUNDAMENTO DEL METODO

El ortofosfato es determinado en la muestra antes y después de la irradiación con luz ultravioleta. Todas las moléculas conteniendo fósforo orgánico son descompuestos a ortofosfatos en el agua irradiada.

La diferencia entre el contenido de ortofosfato de la muestra irradiada y la no irradiada da la cantidad de fósforo inicial en la combinación orgánica.

2. EQUIPOS Y APARATOS ESPECIALES

2.1. Tubos de sílice de 110 ml de capacidad.
2.2. Botellas de polietileno de 500 ml.
2.3. Pipetas automáticas de 5 ml.
2.4. Espectrofotómetro Beckman DU-2.
2.5. Equipo de irradiación ultravioleta.

3. TOMA DE MUESTRA Y SU PROCESAMIENTO

Las muestras de agua de mar deberán ser tomadas inmediatamente que las botellas Van Dorn estén a bordo, en frascos de polietileno de 500 ml; previamente enjuagadas con la muestra de agua de mar que va a ser analizada.

Las muestras que van a ser analizadas inmediatamente se dejan a la temperatura ambiente y cuando los análisis van a realizarse después de 1 a 2 horas deberán ser congelados a — 20°C.

4. REACTIVOS ESPECIALES

4.1. **Solución de molibdato de amonio**

Se disuelve 15 gr de paramolibdato de amonio $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}.H_2O$ Q.P. en 500 ml de agua destilada y se guarda en botellas de polietileno protegido de la luz. La solución será estable indefinidamente.

4.2. **Solución de ácido sulfúrico**

Se agrega 140 ml de acido sulfúrico concentrado Q.P. (g.e. = 1.82) a 900 ml de agua destilada, luego se deja enfriar y se guarda en una botella de vidrio.

4.3. **Solución de ácido ascórbico**

Se disuelve 27 gr de ácido ascórbico Q.P. en 500 ml de agua destilada y se guarda en botellas de polietileno. La solución será estable por muchos meses si se guarda en congelador y no deberá permanecer por más de una semana a la temperatura del laboratorio.

4.4. **Solución de tartrato antimonil potásico**

Se disuelve 0.34 grs de tartrato antimonil potásico Q.P. en 250 mls de agua destilada (calentar si es necesario) y se guarda en una botella de polietileno o de vidrio, la solución será estable por muchos meses.

4.5. **Mezcla de reactivos**

Se mezclan 100 mls de la solución de molibdato de amonio, 250 mls de la solución de ácido sulfúrico, 100 mls de la solución de ácido ascórbico y 30 mls de la solución de tartrato antimonil potásico.
Este reactivo debe ser preparado para cada grupo de análisis y el exceso debe ser descartado, no debiendo guardarse por más de 6 horas.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Medir 50 ml de muestra de agua de mar filtrada (por duplicado) y vacearlo a un erlenmeyer de 125 ml de capacidad (muestra no irradiada).
5.2. Medir 110 mls de la muestra de agua de mar filtrada y vacearlo al tubo de sílice previamente enjuagado con agua de la misma muestra.
5.3. Agregar 2 gotas de agua oxigenada al tubo de sílice que contiene la muestra e inmediatamente tapar y mezclar bien.
5.4. Irradiar con luz ultravioleta la muestra durante 60 minutos.
5.5. Enfriar la muestra a la temperatura del laboratorio.
5.6. Medir 50 ml de su contenido (por duplicado) y trasvasar a un erlenmeyer de 125 ml de capacidad (muestra irradiada).
5.7. Agregar a la muestra irradiada y no irradiada, 5 ml de la mezcla de reactivos (preparado en 4.5).
5.8. Después de 5 minutos se mide la extinción de ambas muestras a 8850°A empleando un espectrofotómetro.

6. DETERMINACION DEL BLANCO

No se usa ningún blanco, debido a que se trata de un método de diferencia. Si se desea realizar un blanco se debe irradiar dos muestras de agua de mar sintética, una con peróxido y otra sin peróxido. Si hay diferencias constantes que superan a 0.005 unidades de extinción, el peróxido debe ser desechado.

7. CALIBRACION

7.1. **Solución estándar de fosfato I**

Disolver 0.816 grs de KH_2PO_4 anhidro, en 100 mls de agua destilada y se guarda en una botella oscura agregando 1 ml de cloroformo. La solución será estable por muchos meses.

$$1 \text{ ml} = 6.0 \ \mu\text{g-at } PO_4 - P$$

7.2. **Solución estándar de fosfato II**

Diluir 10.0 mls de solución estándar I a 1000 mls con agua destilada y guardar en un frasco oscuro agregando 1 ml de cloroformo. La solución será estable por varias semanas, pero se recomienda prepararla cada 10 días.
1 ml = 6.0 × 10 ug-at $PO_4 - P$
1 ml = 0.60 µg-at P/L en 100 ml de muestra de agua de mar.

7.3. **Procedimiento**

Preparar cuatro estándares de 2.5 mls de la solución estándar II (equivalente a 3.0 ug-at P/L) y se lleva a un volumen de 50 ml en una probeta. Luego se mide 50 mls de agua destilada (por duplicado) los cuales actúan como blancos.
Se agrega 5 mls de la mezcla de reactivos (4.5) y después de 5 minutos se mide la extinción a 8850°A empleando un espectrofotómetro.
Este procedimiento sirve para calcular el factor F en la siguiente fórmula:

$$F = \frac{3.00}{E_s - E_b}$$

donde:

E_s = Extinción promedio de los cuatro estándares
E_b = Extinción promedio de los dos blancos

8. CALCULOS

El contenido de fósforo soluble es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g-at P/L} = (E_i - E_{ni})\ F$$

donde: E_i = Extinción de la muestra irradiada
E_{ni} = Extinción de la muestra no irradiada
F = Factor calculado en (7.3).

NOTAS

a) La oxidación requiere gas de oxígeno disuelto en la muestra, el cual está normalmente presente en una concentración suficiente pero, por seguridad, especialmente con muestras profundas, debe agregarse dos gotas de peróxido de hidrógeno. La descomposición durante la irradiación no interfiere con el color desarrollado.

b) Una hora de irradiación se ha encontrado que es suficiente para producir la transformacion del fósforo orgánico en fosfato inorgánico, y un mayor tiempo de exposición no afecta el análisis.

DETERMINACION DE NITROGENO ORGANICO

El metodo por oxidación con luz ultravioleta (Armstrong et al., 1966) es mucho más conveniente y preciso que los métodos clásicos de combustión (Krogh y Kays, 1934) y el de digestión de Kjeldahl seguida de la destilación del amonio (Robinson y Wirth, 1934). Strickland y Parsons (1968) describen el método de Kjeldahl, modificado.

El método descrito a continuación es el de Armstrong (et al., 1966) basado en la alta intensidad de radiación de longitud de onda menor de 2,500°A, catalizando la oxidación de la mayor parte de las moléculas orgánicas conteniendo nitrógeno para dar una mezcla nitrato-nitrito.

1. FUNDAMENTO DEL METODO

Nitrato (más nitrito) es determinado en la muestra por el método de nitrato reactivo antes y después de la iradiación con luz ultravioleta. Los compuestos de nitrógeno orgánico son oxidados a nitrato más nitrito. La diferencia de antes y después de la irradiación es la medida de la cantidad de nitrógeno inicialmente presente en la combinación orgánica.

2. EQUIPOS Y APARATOS ESPECIALES

2.1. Tubos de sílice de 110 ml de capacidad;
2.2. Columna de reducción;
2.3. Erlenmeyer de 125 ml;
2.4. Pipetas automáticas de 1.0 y 2.0 ml;
2.5. Probetas de 100 ml;
2.6. Espectrofotómetro Beckman DU-2; y
2.7. Equipo de irradiación ultravioleta.

3. TOMA DE MUESTRA Y SU PROCESAMIENTO

La muestra de agua de mar (100 ± 2 ml) deberán ser medidas de las botellas muestreadoras con una probeta de 100 ml y puestas en un frasco erlenmeyer de 125 ml. Las muestras son estables por varias horas en frío y en la oscuridad, pero su análisis debe hacerse antes de 10 horas. Si los análisis se van a realizarse después de 10 horas será necesario congelarlas a −20°C.

4. REACTIVOS ESPECIALES

4.1. Solución concentrada de Cloruro de Amonio

Disolver 175 gr de cloruro de amonio Q.P. en 500 ml de agua destilada y guardarlo en una botella de vidrio o polietileno.

4.2. Solución diluida de Cloruro de Amonio

Diluir 50 ml de solución concentrada de cloruro de amonio a 2000 ml con agua destilada, luego guardar la solución en una botella de vidrio o polietileno.

4.3. Solución de Sulfanilamida

Disolver 5 gr de sulfanilamida en una mezcla de 50 ml de ácido clorhídrico concentrado (g.e. 1.18) y 300 ml aproximadamente de agua destilada, luego diluirla a 500 ml con agua destilada. La solución será estable por muchos meses.

4.4. Solución de N-(I-Naftil) Etilendiamina dihidrocloruro

Disolver 0.500 gr de la amina en 500 ml de agua destilada y enseguida guardarla en una botella oscura. La solución deberá renovarse una vez al mes o cuando se desarrolle una fuerte coloración marrón.

4.5. Limaduras de Cadmio

Debe usarse cadmio Q.P.

4.6. Peróxido de hidrógeno

Usar una solución de H_2O_2 Q.P.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Medir 100 ml de la muestra de agua de mar filtrada y vacearlo a un erlenmeyer de 125 ml de capacidad e inmediatamente se agrega 2.0 ml de la solución concentrada de cloruro de amonio y se continúan los siguientes pasos: 5.7, 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12 y 5.13 (muestra no irradiada).
5.2. Medir 100 ml de la muestra de agua de mar filtrada y vacearlo al tubo de sílice previamente enjuagado con agua de la misma muestra.
5.3. Se agrega 2 gotas de peróxido de hidrógeno al tubo de sílice que contiene la muestra e inmediatamente se tapa y agita.
5.4. Se irradia la muestra con luz ultravioleta durante 3 horas.
5.5. Se enfría la muestra a la temperatura del laboratorio (muestra irradiada).
5.6. Se toma 100 ml de agua de mar irradiada y se vacía a un erlenmeyer de 125 ml, luego se agrega 2.0 ml de la solución concentrada de cloruro de amonio.

5.7. Se vacía la muestra en la misma columna reductora por la cual fue procesada la muestra no irradiada.

5.8. En el erlenmeyer se reciben los primeros 40 ml de la muestra, los cuales son desechados dejando tan seco como sea posible el erlenmeyer.

5.9. En el mismo erlenmeyer se colectan los subsiguientes 50 ml de muestra.

5.10. Tan pronto como sea posible se le añade 1.0 ml de reactivo sulfanilamida y se mezcla bien. Luego se deja por espacio de 2 a 8 minutos.

5.11. Se añade 1.0 ml de N-(1-Naftil) etilendiamina y se agita.

5.12. Se espera 10 minutos para que la solución logre su máxima intensidad de color, el cual es estable por lo menos 2 horas.

5.13. Se mide la extinción de la muestra a una longitud de onda de 543 mμ usando un espectrofotómetro y celda de 1.0 cm, 5.0, o de 10 cm según el caso lo requiera.
Si la extinción es mayor que 1.25 (ca. 30 ug-at N/L), se mide en celda de 0.5 cm o se toma 25.0 ml de la solución con una pipeta volumétrica y se vacia a un erlenmeyer y luego se le añade 25.0 ml de agua destilada. Se mezcla bien y se mide su extinción, doblando este valor en la fórmula que ha de emplearse más abajo.
Si la extinción es menor que 0.1 con celda de 1.0 cm se debe repetir la lectura usando celda de 10.0 cm para extinción de 0.1 a 0.2 con celda de 5.0 cm.

6. DETERMINACION DEL BLANCO

No se usa ningún blanco, debido a que se trata de un método de diferencia.

7. CALIBRACION

7.1. Agua de Mar Sintética

Se disuelve 310 gr de cloruro de sodio (ClNa), 100 gr de sulfato de magnesio ($MgSO_4$ $7H_2O$) y 0.50 gr de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$). Deberán se químicamente puros.

7.2. Solución Estándar I

Se disuelve 1.02 gr de nitrato de potasio Q. P. en 1000 ml de agua destilada, usando una fiola aforada. La solución es estable indefinidamente en ausencia de evaporación.

1 ml = 10.0 μg-at Nitrógeno

7.3. Solución Estándar II

Se diluye 2.0 ml de la solución de Nitrato Estándar I a 1000 ml con agua de Mar Sintética. Esta solución deberá ser guardada en botella oscura y será preparada inmediatamente antes de su uso.

Concentración = 20 μg-at N/L

7.4. Procedimiento

Se toma 100 ml de la solución estándar II de nitrato y se transfiere a un erlenmeyer de 125 ml y se procede como se ha indicado anteriormente. Luego se mide la extinción de la muestra usando celda de 1.0 cm.
El factor para cada columna inicialmente debe ser determinado del promedio de la extinción de 3 estándares y corregida por la extinción del reactivo en blanco. Subsiguientemente cada columna será chequeada diariamente con su estándar.

El factor F es calculado de la expresión:

$$F = \frac{20.0}{E'_s - E'_b}$$

donde: E'_s = La extinción media de los 3 estándares para cada columna.
E'_b = La extinción media de los 2 blancos (Ver determinación de nitrato reactivo).

De la eficiencia de la lámpara: A causa de la incertidumbre de la eficiencia de la lámpara será necesario chequearla todos los días irradiando agua de mar sintética, para lo cual se agrega $\alpha - \alpha'$ dipiridilo como fuentes de nitrógeno orgánico.

El blanco de nitrógeno orgánico se prepara agregando 1.0 ml de la solución de dipiridilo a 99 ml de agua de mar sintética. La solución de dipiridilo se prepara disolviendo 0.117 grs de $\alpha - \alpha'$ dipiridilo en 400 ml de agua destilada y luego se completa a 1000 ml.

1 ml = 1.5 μg-at N.

La lámpara debe dar una recuperación teórica mayor del 90%, para una muestra de 15 ug-at N/lt de lo contrario debe ser desechada.

8. CALCULOS

El nitrógeno orgánico soluble se calcula de la siguiente expresión:

$$\mu g\text{-at } N/Lt = (E \times F) - (C \times X)$$

Donde:

F = Es el factor de la columna reductora
C = Es la concentración de amoníaco
X = Tiene un valor de 0.5, 0.75 ó 1, según que el contenido de nitrato en el agua de mar no irradiada este en el rango de 15-25, 25-35, ó 35-45 μg-at N/Lt, respectivamente.

NOTAS:

a) El Nitrógeno orgánico también puede ser obtenido sustrayendo del total de nitrógeno (muestra no filtrada) menos la suma de nitratos, nitritos y amoniaco determinado separadamente.
b) El uso continuo de las limaduras de amalgama de cadmio puede ocasionar una progresiva desactivación del reductor, debido posiblemente a la formación de una capa de hidróxido de cadmio o carbonato.
La presencia de un poquito de cloruro de amonio bufferiza o "sella" el agua de mar haciéndola algo ácida, el cual no desactiva las columnas.
c) No es necesario lavar las columnas entre muestras, pero si permanece sin uso por varias horas será necesario lavarlas con 50 ml de solución diluida de cloruro de amonio antes de usarlo otra vez.
d) Cantidades superiores a 2 mg S^{-2}/L se ha dicho que no interfiere en el método descrito, sin embargo repetidos análisis puede desactivar las columnas debido a la formación de sulfuro de cadmio.

ANALISIS DE MATERIA ORGANICA PARTICULADA

DETERMINACION DE PARTICULA DE CARBON

Existen varios métodos para la determinación de partícula de carbón. Johnson (1949) ha descrito un método basado en la oxidación húmeda del carbón por el ácido dicromático, el cual fue modificado por Strickland y Parson (1968).

Un método más exacto que los anteriores es el de combustion en oxígeno, para lo cual existen en el mercado varias marcas de analizadores de Carbón-Hidrógeno. Varios investigadores han usado el analizador infrarrojo CO_2 para complementar la combustión seca del material particulado, pero el uso de la combustión directa de las ampollas ha sido usado por Strickland y Parson (1968). Sharp (1973) señala que los métodos de alta temperatura son más convenientes y ha introducido mejoras en las técnicas para los análisis de partículas de carbón y nitrógeno, usando analizador CHN. Otras modificaciones han sido desarrolladas por Wangersky y Gordon (1965), Szekielda y Krey (1965) y por Gordon Jr. (1969).

El método descrito a continuación es el de Menzel y Vaccaro (1964), modificado.

1. FUNDAMENTO

Las muestras de agua de mar son purificadas de los compuestos de carbón inorgánico mediante acidificación y burbujeo con nitrógeno puro.

El fundamento es el mismo que el de Carbón Orgánico disuelto y el procedimiento es casi idéntico, la única diferencia es que la muestra se encuentra en un filtro, el cual es introducido en una ampolla que contiene 2 mls de agua destilada libre de materia orgánica.

2. EQUIPOS Y APARATOS ESPECIALES

2.1. Ampollas de vidrio o similar de 10 ml KIMAC.
2.2. Jeringa hipodérmica tipo tuberculina 1.0ml.
2.3. Jeringa hipodérmica 10 ml.
2.4. Micro-cuchara (espátula) contenido para 130 mg. $K_2S_2O_8$.
2.5. Horno - mufla.
2.6. Micro-embudo de vidrio, apropiado para el tope de la ampolla de 10 ml para introducir el persulfato.
2.7. Analizador infrarrojo BECKMAN IR 215 B.
2.8. Filtros de fibra de vidrio WHATMAN GFC.
2.9. Equipo de filtración con su respectiva bomba de vacío.
2.10. Equipo para el sellado de ampollas

3. TOMA DE MUESTRA Y SU PROCESAMIENTO

3.1. Las muestras de agua de mar deberán ser tomadas inmediatamente que las botellas Van Dorn estén a bordo.
3.2. Se filtra al vacío un litro de agua de mar, usando un filtro WHATMAN GFC. y luego se guarda en una bolsita, en refrigeración, cuando el análisis no se va a realizar a bordo.

4. REACTIVOS ESPECIALES

4.1. Cilindros CO_2 y N_2 con válvula de reducción y manómetro.
4.2. Carbón activado.
4.3. E.D.T.A. o titriplex (ácido etilendinitrilotetraacético).
4.4. Ascarita (asbesto en hidróxido de sodio).
4.6. Anhidrona (perclorato de magnesio).
4.5. Solución de ioduro de potasio.
4.7. Agua destilada libre de materia orgánica: se bidestila un litro de agua destilada conteniendo 10 grs de persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ y 1 ml de ácido fosfórico al 85%; se eliminan los primeros 100 ml y los últimos 200 ml. Esta agua no debe contener más de 0.2 mg C/L.
4.8. Acido fosfórico 3% V/V.
Diluir 3.0 ml de (grado analítico 85%) ácido fosfórico H_3PO_4 a 100 ml, con agua libre de materia orgánica y luego guardarlo en una botella de vidrio bien cerrada.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Se filtra el volumen de agua de mar necesario para el análisis usando una bomba de vacío y filtro de vidrio Whatman GFC.
5.2. El filtro se dobla cuidadosamente, luego se coloca dentro de una ampolla, conteniendo 2 ml de agua destilada libre de contaminación orgánica.
5.3. Se coloca la ampolla en el destructor de ampollas y se espera hasta que fluya el contaminante atmosférico, el cual aparecera en el registrador como un pequeño pico de CO_2.
5.4. Con la ayuda de un alicate se rompe el extremo superior de la ampolla y se introduce rá-

pidamente la cánula hasta hacer contacto con la solución, el gas transportador pasa a través de la Anhidrona (para extraer el agua) luego entra al analizador infrarrojo Beckman IR 215-B, el cual registra picos que luego son integrados con un registrador integrador Beckman o con la ayuda de un planímetro.

5.5. Después que la ampolla es analizada se reemplaza rápidamente con otra ampolla.

6. DETERMINACION DEL BLANCO

El blanco se determina de la siguiente manera:

6.1. Se coloca un filtro nuevo en una ampolla de vidrio;
6.2. Se sigue el procedimiento descrito anteriormente (5); y
6.3. Se determina el área del blanco dada por el instrumento.

7. CALIBRACION

Se pesa EDTA como estándar en pequeños botes de aluminio libre de contaminantes, luego se coloca el bote conteniendo el estándar en una ampolla limpia y se continúa como en el procedimiento anterior (5).

8. CALCULOS

8.1. Se pesa el bote de aluminio (A).

8.2. Se pesa el bote + EDTA (B).

8.3. La diferencia de B — A = mgs de EDTA, o si se desea expresar en µg. de EDTA se multiplica × 1000.

8.4. La cantidad de ug. de carbón se obtiene multiplicando los mg o µg de EDTA × 0.3227.

8.5. Se grafica el área hallada de los mg o µg. de carbono, versus la concentración de carbono.

8.6. Se obtiene una hipérbola $y = a x^2 + bx + C$ de 2 do. orden.

8.7. Se halla la concentración de carbono (x) de la muestra problema y se resta de la concentración del blanco.

NOTAS:

a) Las ampollas, filtros y botes de aluminio deben estar libre de contaminantes para lo cual se lleva a 500°C en una mufla durante una hora.

b) Las muestras deben ser colectadas con sumo cuidado y limpieza.

c) El volumen de muestra filtrada depende del contenido de carbón en el agua; para muestras oceánicas filtrar 5 lts y para aguas cercanas a la costa 1 litro.

DETERMINACION DE PARTICULA DE FOSFORO

El método descrito a continuación es el dado por Strickland y Parson (1968), el cual esta basado en el método de Hansen y Robinson (1953).

1. FUNDAMENTO

El filtro conteniendo las partículas de fósforo son tratados con ácido perclórico y el residuo es calentado para oxidar la materia orgánica y liberan el fósforo como fosfato inorgánico. Los fosfatos son tratados con una mezcla de reactivos que contienen ácido molibdico, ácido ascórbico y antimonio trivalente; el complejo resultante es reducido in situ para dar una coloración azul el cual es medido en un espectrofotómetro a 8850°A.

2. EQUIPOS Y APARATOS ESPECIALES

2.1. Equipo de filtración al vacío.
2.2. Filtros de menbrana Millipore.
2.3. Probetas graduadas de 50 mls con tapón de vidrio.
2.4. Plancha de calentamiento asociado a un extractor.
2.5. Pipetas automáticas de 5 mls.
2.6. Erlenmeyer de 125 mls. de capacidad.
2.7. Espectrofotómetro Beckman DU-2.

3. TOMA DE MUESTRA Y SU PROCESAMIENTO

Las muestras deben ser filtradas a bordo o bien almacenadas en botellas de polietileno de 500 ml y guardadas en una congeladora a -20°C, para proceder a su filtración en el laboratorio.

La filtración se lleva a cabo agregando 3 ml de una suspensión de carbonato de magnesio al filtro, y luego, si los análisis no se van a efectuar deberán ser guardados en petrys.

4. REACTIVOS

4.1. **Solución diluida de amoníaco**

Se toman 100 ml de una solución concentrada de amoníaco Q.P. - (g.e. 0.90) y se diluye a 500 ml con agua destilada, y luego se guarda en una botella de polietileno herméticamente cerrada. Se recomienda preparar la solución cada semana.

4.2. **Agua acidificada**

Diluir 2 ml de ácido clorhídrico concentrado (g. e. 1.14) a un litro con agua destilada, y guardarla en una botella de polietileno o de vidrio. La solución deberá ser preparada cada 6 meses.

4.3. **Solución de ácido perclórico** ($HClO_4$)

Diluir 300 ml de ácido perclórico concentrado (70 a 72%) a un litro con agua destilada y guardarla en una botella de vidrio.

4.4. Solución de molibdato de amonio

Se disuelve 15 gr de paramolibdato de amonio Q.P. $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4H_2O$ en 500 ml de agua destilada, y se guarda en una botella de polietileno protegida de la luz. La solución será estable indefinidamente.

4.4.1. Solución de ácido sulfúrico

Se agrega 140 ml de ácido sulfúrico concentrado Q.P. (g. e. 1.82) a 900 ml de agua destilada, luego se deja enfriar y se guarda en una botella de vidrio.

4.4.2. Solución de ácido ascórbico

Se disuelven 27 gr de ácido ascórbico Q.P. en 500 ml de agua destilada y se guarda en una botella de polietileno. La solución será estable por muchos meses si se guarda en un congelador.

4.4.3. Solución de Tartrato Antimonil Potásico

Se disuelve 0.34 gr de tartrato antimonil potásico Q.P. en 250 ml de agua destilada (calentar si es necesario) y se guarda en una botella de polietileno o de vidrio. La solución será estable por muchos meses.

4.5. Mezcla de Reactivos

Se mezcla 100 ml de la solución de molibdato de amonio, 250 ml de ácido sulfúrico, 100 ml de la solución de ácido ascórbico y 30 ml de la solución tartrato antimonil potásico. Este reactivo debe ser preparado para cada grupo de análisis y el exceso deberá ser descartado y no deberá guardarse por más de 6 horas.

4.6. Gránulos de Carborundum

Los gránulos de carborundum de diámetro aproximado a 1/2 - 1/8 de pulgada se tratan con ácido perclórico durante dos horas y luego se enjuagan con agua destilada caliente. Los gránulos deben ser manipulados con pinzas y ser hervidos por 10 minutos (con Hcl al 50% en volumen) antes de su uso o después de un tiempo prolongado.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. El contenido del filtro es pasado a un erlenmeyer de 125 ml mediante un chorro de agua destilada.

5.2. Agregar 1 ml de ácido perclórico y 5 gotas de ácido nítrico concentrado al erlenmeyer.

5.3. Evaporar la solución hasta humos blancos (de ácido perclórico y óxido nitroso) y continuar calentando hasta la sequedad, sin llegar a la calcinación.

5.4. Enfriar el erlenmeyer y agregar un gránulo de carborundum y 25 ml de agua destilada. Luego se hace hervir la solución vigorosamente durante 30 minutos hasta hidrolizar algo de polifosfato formado por la fumigación de ácido perclórico.

5.5. Agregar 5 ml de la solución de amoníaco diluido y hervir hasta que no quede ningún olor a amoníaco, luego agregar 20 ml de agua acidulada para disolver algo del precipitado.

5.6. Enfriar el erlenmeyer y verter el contenido en una probeta. Se enjuaga el erlenmeyer con agua destilada y se vierte nuevamente a la probeta y se completa a un volumen de 50 ml.

5.7. Agregar 5 ml de la mezcla de reactivo y agitarlo.

5.8. Después de 5 minutos se mide la extinción a 8850°A empleando un espectrofotómetro (con celda de 10 cm).

5.9. Se corrige la extinción con respecto al blanco.

6. DETERMINACION DEL BLANCO

El blanco es preparado agregando 2 ml de suspensión de carbonato de magnesio en un erlenmeyer de 125 ml, luego se continúa como en el procedimiento descrito anteriormente.

7. CALIBRACION

7.1. Preparación de soluciones estándares

7.1.1. Estándar de fosfato I

Se pesa 0.816 gr de $KH_2 PO_4$ anhidro el cual ha sido previamente secado durante 3 horas a 120°C y se disuelve en 1 litro de agua destilada, usando una fiola aforada, luego se agrega 1.0 ml. de cloroformo como preservativo y se guarda en una botella oscura. La solución será estable por muchos meses.

$$1 \text{ ml} = 6.0 \ \mu\text{g-at } PO_4 - P$$

7.1.2. Estándar de Fosfato II

Se toma 5 ml del estándar I y se diluye a 1000 ml con agua destilada.

1 ml = 0.60 µg-at P/L en 50 ml de agua

7.2. Procedimiento

Se preparan 3 soluciones estándares tomando 5 ml de la solucion estándar II y se vierte a un erlenmeyer de 125 ml de capacidad (reservar dos frascos para determinación del blanco y continuar como se describe en el procedimiento anterior).

El factor F es calculado de la expresión:

$$F = \frac{4.65}{Es - Eb}$$

Donde:

Es = a la extinción promedio de los estandares.

Eb = a la extinción promedio de los blancos.

8. CALCULOS

La concentración de partícula de fósforo es calculada de la siguiente manera:

$$mg\ P/m^3 = \frac{F \times E_c}{V}$$

Donde:

V = Volumen en litros de la muestra usada

F = Factor obtenido en Procedimiento (7)

Ec = Extinción corregida obtenida en el Procedimiento (5).

DETERMINACION DE PARTICULA DE NITROGENO

Hay varios métodos para la determinación de partícula de Nitrógeno basados en:

a) Combustión de Dumas (Menzel y Ryther, 1964).
b) Oxidación de nitrógeno orgánico a nitrato, luego determinado colorimétricamente (Eppley et al., 1967).
c) Digestión de Kjeldahl seguido de la determinación de amonio (Strickland y Parson, 1968).
d) Usando Nynhydrin — Hydrindantin (Moore y Stein, 1954), cuyo método fue modificado por Jacobs (1962), siendo este último mejorado por Holm-Hansen (1968).
e) Empleando alta temperatura de combustión seguida de la detección con un analizador infrarrojo (Menzel y Vaccaro, 1964; Gordon, 1969; Loder, 1971).
f) Con analizadores automáticos de carbón y nitrógeno para lo cual se han desarrollado varias técnicas (Gordon, 1969 y 1973; Small y Rambers, 1971; Caperon y Meyer, 1972; Gunderson et al., 1972; Thomas y Dodson, 1972). Sharp, 1973 señala que los métodos de alta temperatura son más convenientes y ha introducido mejoras en las técnicas para los análisis de partícula de carbón y nitrógeno, usando analizador CHN.

El método descrito a continuación es el Micro-Dumas, usando el analizador de Nitrógeno Coleman Modelo 29, de acuerdo a las modificaciones introducidas por Strickland y Parson (1968).

1. FUNDAMENTO

El nitrógeno combinado en la forma orgánica es liberado como nitrógeno gaseoso por calentamiento, el cual es medido manométricamente después de remover el gas portador de dióxido de carbono en una cámara de absorción caústica.

2. EQUIPOS Y APARATOS ESPECIALES

2.1. Soleman Model 29 Nitrogen Analyzer.
2.2. Semimicrobalanza.
2.3. Filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C de 4.5 cm de diámetro.
2.4. Tubos de combustión.
2.5. Equipo de filtración con su respectiva bomba de vacío.

3. TOMA DE MUESTRA Y SU PROCESAMIENTO

3.1. Las muestras de agua de mar deberan ser tomadas inmediatamente que las botellas Van Dorn estén a bordo.
3.2. Filtrar 5 litros de agua de mar al vacío, usando un filtro de fibra de vidrio GF/C, a una presión no mayor de 1/4 de atmósfera.
3.3. Una vez terminada la filtración se suspende el vacío y se añade 2 ml de solución de sulfato de sodio y se repite la operación hasta que el filtro quede seco. Se repite esta operación una vez más, agregando 2 ml de solución de sulfato de sodio.
3.4. El filtro seco se coloca en una bolsita y luego se guarda en una congeladora a — 20°C.

4. REACTIVOS ESPECIALES

4.1. Un cilindro de Anhidrido Carbónico Q. P.
4.2. Causticón
4.3. Cuprox
4.4. Cuprin
4.5. Mercurio
4.6. Sulfato de Sodio Q. P.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Se coloca el filtro conteniendo la muestra dentro del tubo de combustión con la ayuda de una pinza hasta la marca indicada.
5.2. Se cubre la muestra con CUPROX hasta aproximadamente 5 cm del extremo del tubo.
5.3. Se continúa el procedimiento de acuerdo a lo recomendado por el fabricante (con respecto al instrumento) y se determina el volumen de gas nitrógeno liberado por la muestra.
5.4. Se hacen correcciones debidas al blanco, presión barométrica y temperatura de la muestra.

6. DETERMINACION DEL BLANCO

El blanco es definido como aquel volumen de gas absorbido en el "Nitrometer" del analizador de nitrógeno como resultado de un ciclo completo de combustión. Antes que se realice el análisis de la muestra

deberá establecerse la reproductibilidad del blanco, el cual debe ser pequeño en relación al volumen de nitrógeno contenido en la muestra y determinado en las mismas condiciones de la muestra.

6.1. PROCEDIMIENTO

6.1.1. Se coloca el filtro Whatman GFC sin usar en el tubo de combustión.

6.1.2. Llenar el tubo de combustión del analizador de nitrógeno con cuprox y cuprin como si fuera a procesarse una muestra.

6.1.3. Se continúa de acuerdo a lo recomendado por el fabricante para determinar el volumen de N_2 liberado por el blanco.

7. CALCULOS

La cantidad de nitrógeno (en mg de N/m^3) en la muestra se halla de la siguiente forma:

$$mg\ N/m^3 = \frac{V_c\ (\text{en } \mu l)}{\text{Volumen de agua de mar filtrada (en l.)}} \times 1.25$$

donde:

V_c = Corrección del volumen de Nitrógeno (µl) y es igual a:

$V_c = V_o - (V_b - V_t)$ donde:

V_b = Es el volumen del blanco en microlitros,

V_o = Es el volumen del nitrógeno observado (µl) y es igual a

$V_o = R_2 - R_1$; R_2 y R_1 es la lectura final e inicial del contador respectivamente.

V_t = Es la corrección del volumen por temperatura (µl):

$V_t = Cf\ (t_2 - t_1)$

t_2 y t_1 es la temperatura final e inicial en °k (en el termómetro) de la jeringa del instrumento (273°K = 0°C); Cf basado en la lectura final del contador en µl. Ver apéndice. (Tabla Nº 2).

NOTAS:

a) La partícula nitrógeno también puede ser obtenido sustrayendo del total de nitrógeno (muestra no filtrada) menos el nitrógeno orgánico soluble.

b) Los blancos deben ser constantes y reproducibles.

c) Por lo general se usan blancos que den como término medio 10 microlitros; valores menores de 5 microlitros son fácilmente obtenibles si el CO_2 es de alta pureza y el tren de combustión y accesorios auxiliares estan libres de nitrógeno. Valores mayores de 10 microlitros indican impurezas del CO_2. Los blancos irregulares indican fugas en las conexiones de gas o la presencia de contaminantes.

TABLA Nº 2

VOLUMEN DE CORRECCION POR TEMPERATURA

Lectura final del contador (µl)	Volumen de corrección por temperatura Cf por °C
100	15
200	15
300	16
400	16
500	16
600	16
700	17
800	17
900	18
1000	18
1100	18
1200	19
1300	19
1400	20
1500	20
1600	20
1700	20
1800	21
1900	21
2000	21
2100	21
2300	22
2400	23
2500	23
2600	23
2700	24
2800	24
2900	25
3000	25
3100	25
3200	26
3300	26
3400	26
3500	26
3900	26
3700	27
3800	27
3900	27
4000	27
4100	27
4200	28
4300	28
4400	28
4500	28

BIBLIOGRAFIA CITADA

AMSTRONG, F. A. J.; P. M. WILLIAMS y J. D. H. STRIKLAND, **Nature**, 211: 481-483. 1966

CARBERG, S. R. **The Infrared (I. R.) Spectrophotometer and its in analytical work.** Fao fisheries technical paper Nº 137: 83-84. 1975

CAPERON, J. y MEYER, J. **Deep Sea Research**, 20: 601-618. 1972

DE LAHAY, PAUL. **Análisis Instrumental:** Ed Paraninfo, Madrid 15, 448 p. 1963

DUURSMA E. K.; NETH J. **Sea Research**, 1:1-141. 1961

ELVELL AND GIDLEY. **Atomic Absortion Spectrophotometer.** Ed Pergamon Press, 134 p. 1967

EPPLEY R. W., R. W. HOLMES y E. PEASCHE **Arch. Mikrobiol**, 56: 305-323. 1967

GILLBRICHT M. **Helgolandes Wiss Meeresuntersuchungen, 6: 76-83.** 1957

GORDON D. C. JR. **Deep Sea Research**, 16(6): 661-665. 1969

——— **Deep Sea Research**, 18: 1127-1134. 1971

GRASSOFF, KLAUS. **(ed) Methods of Seawater Analysis.** Edit Verlag Chemic Weinheim. New York, 1976

GUNDERSON K. C. W. et al. **Limnology Oceanografic**, 17 (4): 524-531.

HALL W. T. **Química Analítica.** Traducción de la novena Edición. Edit. Hispanoamericana. vol. II, p. 887. 1962

HANSEN A. L. y R. J. **Journal Marine Research** 12:31.

HERMAN and ALKEMADE C. T. J. **Chemical Analysis by Flame Photometry**, Edit Intersciencie publishers, vol. 14, Tercera Edición, 580 p. 1963

HOLM - HAMSEN O. **Limnology Oceanography**, 13: 175-178. 1968

INSTRUCTION MANUAL, **Atomic Absorption Flame Emission Spectrophotometer. Model. Dial-Atom Mark II.** Jarrel Ash (fabricante), p. 38. 1973

INSTRUCTION MANUAL, **Autoanalizador II Mod.** Technicon, p. 490. s/f

INSTRUCTION MANUAL, **Gas Chromatography. Mod. I440.** Varian Aerograph. All (fabricante). p. 218. 1974

INSTRUCTION MANUAL, **Infrared Analizer. Mod. 215 B** Beckman Instruments (fabricante). p. 96 1971

INSTRUCTION MANUAL, **Liquid Scintillación System. Mod. Ls-100C** Beckman, (fabricante). p. 34. 1973

INSTRUCTION MANUAL, **Photometer A. T. P. Model. J. B. R.** p. 83. 1972

INSTRUCTION MANUAL, **Nitrogen Analyzer. Mod. 29.** Perkin-Elmer (fabricante), p. 40. 1971

KIRK BRIGHT and SARGENT M. **Atomic Absortion and Fluorescience Spectroscopy.** Edit. Academic Press, London, p. 798. 1974

KORRINGA P. Y H. POSTMA. **Pubbl. Staz. Zool. Napolí**, 24: 229-284 1957

KROGH A. and A. KEYS. **Biology Bulletin** 67: 132-193 1934

LADD. C. y LEE. H. **Práctica de Radioquímica.** Ed Acribia. Zaragosa España, p. II0. 1969

LODER T. C. **Dissertation University of Alaska** p. 236 1971

MENZEL D. W. **Limnology Oceanography**, 9:138-143.

NAIR and BONELLI J. **Basic Gas Cromatography.** Edit. Varian Aerograph p. 301. 1969

ROBINSON R. J. and WIRTH. Perm. Interm. Exp. Mer., (9) p. 187. 1934

SANDELL F. B. **Colorimetric. Determination of traces.** Ed. Intercience. Publisher. J. Wiley Sons. Inc., p. 987.

STRICKLAND, J. D. H. and PARSON T. R. **Apractical Handbok of seawater Analysis.** Edit. Fisheries Research Board of Canada, Otawa. 1972

SHARP J. H. **Limnology Oceanography**, 19(6): 984-989. 1974

SNELL F. D. and SNELL G. T. **Colorimetric Methods** of analysis. Edit Van Nostrand, p. 603. 1954

THOMAS W. H. and DODSOW A. N. **Limnology Oceanography** 17(4): 515-523. 1972

VEN HALL et. al. Analitycal Chemistry, 35: 315-319. 1963

VOGEL, A. I. **Química Analítica Cuantitativa.** Edit. Kapeluz, Buenos Aires. Vol. II, p. 500. 1970

WANGERSKY P. and GORDON. **Limnology Oceanography**, 10 (4): 554-560. 1965

WILSON R. F. **Limnology Oceanography**, 6: 259-261. 1961

WILLARD-MERRIT J. A. **Métodos Instrumentales de Análisis.** Edit. Continental S. A. México, p. 965. 1972

Este Boletín se terminó de imprimir en los Talleres Gráficos de Editorial y Librería Salesiana el mes de Noviembre de 1977

* *
*