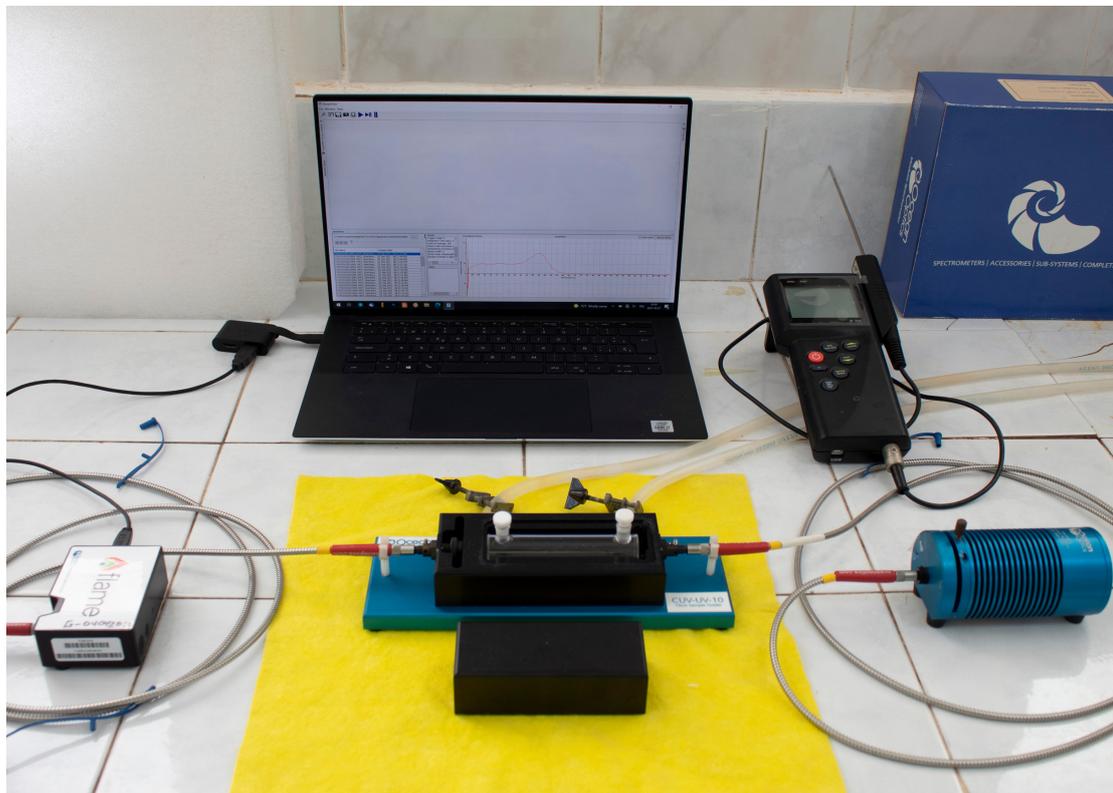


# DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PH EN AGUA DE MAR UTILIZANDO INDICADOR PÚRPURA DE META-CRESOL PURIFICADO Y UN ESPECTROFOTÓMETRO OCEAN OPTICS



**REMARCO**  
REMARCO-AO-P-02  
V.01

Octubre, 2021

## Elaborado por:

Miguel Gómez Batista- CEAC, Cuba  
Joan Albert Sanchez-Cabeza – ICML-UNAM, México  
Héctor Cartas Aguila – CEAC, Cuba  
Elianet Pérez Pérez – CEAC, Cuba  
Gerardo Ruíz-Rodríguez – LABTOX-UES, El Salvador

Jonathan Herrera Merlo – CIRA-UNAN, Nicaragua  
Cesar A. Bernal – INVEMAR, Colombia

## Edición:

Cesar A. Bernal – INVEMAR, Colombia

## Comité Ejecutivo de REMARCO

### Representante de Acidificación de Océanos

Cesar Augusto Bernal  
Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andrés” – INVEMAR  
COLOMBIA

### Representante de Contaminación Química

Ana Carolina Ruiz-Fernández  
Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM.  
MÉXICO

### Representante de Floraciones Algales

Benjamin Suarez Isla  
Universidad de Chile (LABTOX-UCHILE).  
CHILE

### Representante de Microplásticos

Denise Delvalle Borrero  
Universidad Tecnológica de Panamá  
PANAMÁ

### Representante de Comunicaciones

Laura Brenes Alfaro.  
Centro de Investigación en Contaminación Ambiental – CICA.  
COSTA RICA

### EQUIPO IAEA

#### Project Management Officer RLA/7/025

Magali Zapata Cazier  
Organismo Internacional de Energía Atómica - OIEA

#### Technical Officer RLA/7/025

Carlos Manuel Alonso Hernández  
Organismo Internacional de Energía Atómica - OIEA

**Imagen de portada:** Montaje determinación de pH por espectrofotometría en agua de mar, Ocean Optics - CEAC.

**Foto:** Miguel Gómez.

### Citar como:

Gómez M., Sanchez-Cabeza J.A., Cartas H., Pérez, E., Ruiz G., Herrera J. & Bernal C. (2021). Determinación espectrofotométrica de pH en agua de mar utilizando indicador púrpura de meta-cresol purificado y un espectrofotómetro Ocean Optics. Red de Investigación de Estresores Marinos - Costeros en Latinoamérica y El Caribe – REMARCO. Santa Marta, Colombia. 20 pp. <https://remarco.org/manual-ao/>

REMARCO agradece al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) el soporte para la elaboración del presente documento, a través del proyecto de Cooperación Técnica RLA/7/025.

Este material no tiene fines de lucro. Se prohíbe su venta. Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión del contenido de este producto para propósitos educativos u otros fines no comerciales, sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor, siempre que se especifique claramente la fuente.

**TABLA DE CONTENIDO**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>OBJETIVO .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2</b> | <b>ALCANCE.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>3</b> | <b>TÉRMINOS Y DEFINICIONES .....</b>                              | <b>4</b>  |
| <b>4</b> | <b>FUNDAMENTO TEÓRICO .....</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>5</b> | <b>MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....</b>                       | <b>5</b>  |
| 5.1      | MATERIALES .....  | 5         |
| 5.2      | REACTIVOS.....  | 6         |
| 5.3      | EQUIPOS.....  | 6         |
| <b>6</b> | <b>DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES.....</b>                            | <b>6</b>  |
| 6.1      | ENSAMBLAJE DEL ESPECTROFOTÓMETRO .....                            | 6         |
| 6.2      | MANTENIMIENTO DE LAS CUBETAS DE MEDICIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA..... | 7         |
| 6.3      | PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE PÚRPURA DE META CRESOL .....        | 7         |
| 6.4      | CAPTACIÓN DE LA MUESTRA.....                                      | 8         |
| 6.5      | PREPARACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA MEDICIÓN .....             | 9         |
| 6.6      | COMPROBACIÓN DEL PH DE LA SOLUCIÓN INDICADORA.....                | 9         |
| 6.7      | CONFIGURACIÓN DEL MODO DE OPERACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO .....   | 9         |
| 6.8      | MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA DE LA MUESTRA .....                    | 12        |
| 6.9      | REGISTRO DE DATOS .....   | 15        |
| 6.10     | CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS .....                       | 15        |
| <b>7</b> | <b>CONTROL DE CALIDAD .....</b>                                   | <b>18</b> |
| <b>8</b> | <b>MANEJO DE RESIDUOS .....</b>                                   | <b>19</b> |
| <b>9</b> | <b>DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....</b>                              | <b>19</b> |



## 1 OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación del pH en aguas marino-costeras mediante espectrofotometría utilizando indicador púrpura de meta-cresol purificado y un espectrofotómetro Ocean Optics, FLAME-S-VIS.

## 2 ALCANCE

Este método está recomendado para los laboratorios de la red REMARCO que realicen determinaciones de pH en agua marino-costeras con método espectrofotométrico utilizando indicador púrpura de meta-cresol purificado y un espectrofotómetro Ocean Optics, FLAME-S-VIS.

Está basado en el procedimiento estándar de operación 6b (Dickson et al., 2007). El mismo está diseñado para cumplir con la categoría de calidad "Weather" (incertidumbre del pH < 0.02) según lo establecido en el indicador 14.3.1 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

Las muestras de agua deben colectarse, preservarse y almacenarse de acuerdo con el procedimiento "Recolección y preservación de muestras para la medición de variables del sistema de CO<sub>2</sub> en aguas marino – costeras" REMARCO-AO-P-01 ubicado en <https://remarco.org/manual-ao/>

## 3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

$[H^+]$ : Concentración de total de iones hidrógeno ( $\text{mol kg}^{-1}$ ). En el agua de mar incluye la contribución del ion sulfato.

$$[H^+] = [H^+]_F (1 + S_T/K_S) \approx [H^+]_F + [HSO_4^-]$$

$[H^+]_F$ : Concentración libre (*free*) del ion hidrógeno en agua de mar.

$S_T$ : Concentración total de sulfato.

$K_S$ : Constante de disociación ácida del  $HSO_4^-$ .

$$pH = -\log_{10} \left( \frac{[H^+]}{\text{mol kg}^{-1}} \right) \text{ Donde } [H^+] \text{ representa la concentración total de iones hidrógeno.}$$

T: Temperatura (K).

K: Kelvin = ( $^{\circ}\text{C} + 273.15$ ).

S: Salinidad (sin unidades).

$HI_n^-$ : especie protonada del indicador.

$I_n^{2-}$ : especie no protonada del indicador.

A: Absorbancia.

$\lambda$ : Longitud de onda (nm).

$\epsilon_{\lambda}(x)$ : Coeficiente de extinción o absorptividad molar para  $\lambda$  y la especie x del indicador.

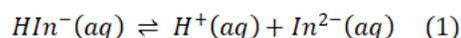
$K_2$ : Constante aparente de disociación de la especie protonada del indicador.

$pK_2$ :  $\log_{10}$  de la constante de disociación del indicador.

mCP: Indicador púrpura de meta-cresol.

#### 4 FUNDAMENTO TEÓRICO

El valor del pH es determinado por la adición de un indicador en agua de mar. Para indicadores sulfoneftaleínicos como púrpura de meta cresol (mCP), la reacción de interés del pH en el agua de mar está determinada por la segunda disociación:



La concentración total del ion hidrógeno puede entonces determinarse de la siguiente forma:

$$pH = -\log_{10}K(HIn^{-}) + \log_{10} \frac{[In^{2-}]}{[HIn^{-}]} \quad (2)$$

A una longitud de onda determinada  $\lambda$  la absorbancia medida en una celda con un camino óptico  $l$  está dada por la ley de Lambert- Beer:

$$\frac{A_{\lambda}}{l} = \varepsilon_{\lambda}(HIn^{-})[HIn^{-}] + \varepsilon_{\lambda}(In^{2-})[In^{2-}] + B_{\lambda} + e \quad (3)$$

donde  $B_{\lambda}$  corresponde a la absorbancia de fondo de la muestra (blanco) y  $e$  es un término de error debido al ruido instrumental. Las absorbancias medidas a dos o más longitudes de ondas pueden ser usadas para estimar la proporción  $[In^{2-}]/[HIn^{-}]$ . Para una mejor sensibilidad, se utilizan las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorbancia de la base ( $In^{2-}$ ) y el ácido ( $HIn^{-}$ ), respectivamente. Los máximos de absorbancia del indicador mCP se presentan en las longitudes de onda 578 nm (máximo de absorbancia de la forma básica) y 434 nm (máximo de absorbancia de la forma ácida).

#### 5 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

##### 5.1 Materiales

- ✓ Cubeta de cristal óptico o cuarzo, forma cilíndrica, 10 cm de paso de luz, dos puertos con tapas de teflón (HELMA).Tubo conductor (TYGON).
- ✓ Micropipeta de volumen ajustable entre 20-200  $\mu$ L.
- ✓ Pipeta pasteur 50 mL.
- ✓ Frasco volumétrico de 100 mL.
- ✓ Vaso de precipitado 150 mL.
- ✓ Frasco lavador con agua desionizada.
- ✓ Bolsas tipo Ziploc.
- ✓ Guantes libres de polvo o talco.

- ✓ Papel libre de fibras por ejemplo los de marca “Kimwipes”.
- ✓ Cuaderno de anotaciones o registro primario de datos.

## 5.2 Reactivos

- ✓ Solución indicadora de púrpura de meta cresol (mCP) a concentración ( $\sim 2 \text{ mmol L}^{-1}$ ).
- ✓ Solución de NaOH a concentración de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .
- ✓ Solución de HCl a concentración de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .
- ✓ NaCl con pureza 99.5 %.
- ✓ Buffer pH 4.
- ✓ Buffer pH 7.
- ✓ Buffer pH 10.
- ✓ Buffer Tris en agua de mar sintética (Dickson's lab, SCRIPPS Institute, La Jolla, CA, co2crms@ucsd.edu).
- ✓ Material de Referencia Certificado para mediciones de  $\text{CO}_2$  en agua de mar (SCRIPPS Institute, La Jolla, CA, co2crms@ucsd.edu). Opcional para la preparación de la solución indicadora.
- ✓ Agua desionizada.

## 5.3 Equipos

- ✓ Espectrofotómetro (Ocean Optics, FLAME-S-VIS-NIR-ES).
- ✓ Fuente de luz halógeno (Ocean Optics, HL-2000-FHSA-LL).
- ✓ Porta cubeta con tapa (Ocean Optics, CUV-UV-10).
- ✓ Fibras ópticas (Ocean Optics, QP200-2-VIS-BX).
- ✓ Computador con software Ocean View.
- ✓ Baño termostático con recirculación ( $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Julabo, CORIO 601F).
- ✓ Baño termostático ( $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Julabo, TW12).
- ✓ Termómetro ( $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ).
- ✓ pH-metro ( $\pm 0.1 \text{ mV}$ ).
- ✓ Balanza (0.0001 g).
- ✓ Agitador magnético.

## 6 DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

### 6.1 Ensamblaje del espectrofotómetro

- Posicionar en el lugar de trabajo la fuente de luz, el porta celdas y el espectrofotómetro de manera que haya suficiente espacio para posicionar las fibras ópticas. En caso de enrollar estas últimas su diámetro de curvatura no debe ser menor a 30 cm para evitar su fractura. Para diámetros de curvatura menores consulte la ficha técnica de las fibras ópticas (OCEAN OPTICS, 2013, 2015).
- Conectar el baño termostático con recirculación con el porta cubetas. Asegúrese que no haya fuga de agua en las conexiones.
- Interconectar la fuente de luz, el porta cubetas y el espectrofotómetro a través de las fibras ópticas. Enrosque suavemente con la mano la fibra óptica en los conectores de la fuente de luz, el porta celdas y el espectrofotómetro respectivamente.
- Conectar la alimentación eléctrica a la fuente de luz.
- Conectar el espectrofotómetro al computador a través de su puerto USB.



Figura 1. Ensamblaje de los componentes del sistema espectrofotométrico (izquierda). Detalles del porta cubetas y posicionamiento de las mismas (derecha).

## 6.2 Mantenimiento de las cubetas de medición espectrofotométrica

Las cubetas de medición deben estar limpias, secas, sin residuos y sus ventanas ópticas en buen estado. Para evitar daños o ralladuras de las ventanas ópticas solo utilice para su secado papel libre de fibras (p.e tipo “Kimwipes”). Para la eliminación de los residuos puede utilizarse solución de HCl al 0.1 N, seguido de un enjuague con abundante agua desionizada. Las mismas deben almacenarse secas y protegidas del polvo.

## 6.3 Preparación de la solución de púrpura de meta cresol

La adición del indicador perturbará el pH de la muestra. La magnitud de la perturbación será menor en la medida que los valores de salinidad, alcalinidad total y pH del indicador sean similares a los de la muestra (Li et al., 2020). Si el indicador se utilizará en aguas con amplio rango de salinidad (especificar qué se considera como amplio rango) Li et al., (2020) sugiere su disolución en una matriz de agua tipo I para minimizar el efecto de la perturbación en aguas con salinidades bajas (o especificar qué se considera salinidad baja). Por otro lado, cuando se analizan aguas con mayores salinidades el indicador puede disolverse en solución con fuerza

iónica equivalente al agua de mar ( $0.7 \text{ mol kg}^{-1}$  de NaCl) (DeGrandpre et al., 2014; GOA-ON in a box.), en agua de mar (Chierici et al., 1999) o en material de referencia certificado (CRM) para determinaciones de  $\text{CO}_2$  en agua de mar (Berghoff, 2020).

- Pesar 0.0762 g de mCP purificado (Peso Molecular:  $382.43 \text{ g mol}^{-1}$ ).
- Disolver en 100 mL de agua tipo I.
- Ajustar el pH de la solución a 8.2 para favorecer la disolución del mCP. Añada alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de solución de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH ó HCl hasta alcanzar pH de 8.2. Entre adiciones sucesivas espere a que se estabilice el pH.
- Agitar la solución durante una noche para permitir la disolución total del mCP, utilice para ello agitador magnético y cubra el recipiente durante la agitación nocturna. Al día siguiente, ajustar a  $\text{pH } 7.9 \pm 0.1$ .

**Nota 1:** El pH de la solución es monitoreado con un pH-metro previamente ajustado con buffers NBS 4, 7,10 (Carter et al., 2013).

- Comprobar la calidad de la solución determinando el pH del buffer Tris (salinidad 35) (SCRIPPS Institute, La Jolla, CA) inmediatamente después de preparada y al menos cuando la solución esté por terminarse.
- Almacenar la solución en recipiente de vidrio color ámbar (en su defecto cubrir el recipiente con papel aluminio), protegida de la luz y preferiblemente a temperatura menor de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . No congelar la solución.
- Registrar en su cuaderno de notas los datos relacionados con el mCP utilizado para preparar la solución: peso molecular, fabricante y lote, anotar además el volumen de indicador preparado, su pH y el tipo de solución en la que fue disuelto, en caso de haber añadido NaCl en su preparación indicar la masa añadida.

**Nota 2:** Aunque lo recomendable es utilizar mCP purificado, en su defecto puede utilizarse el mCP comercialmente disponible. Es recomendable adquirir la sal de sodio ( $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NaO}_5\text{S}$ ,  $\text{PM}=404.41 \text{ g mol}^{-1}$ ) la cual posee una mayor capacidad de disolución en solventes acuosos (Berghoff, 2020; Patsavas et. al., 2013). El mCP comercialmente disponible contiene impurezas las cuales son específicas de la marca y el lote. Estas impurezas disminuyen el pH aparente de la muestra en análisis. Para la corrección del pH determinado utilizando mCP impuro, Douglas y Byrne (2017) desarrollaron un método para determinar la magnitud del efecto de las impurezas sobre la absorbancia a la longitud de onda de 434 nm y su corrección en el cálculo del pH.

#### 6.4 Captación de la muestra

- Las muestras de agua deben colectarse, preservarse y almacenarse de acuerdo con el procedimiento “Recolección y preservación de muestras para la medición de variables del sistema de  $\text{CO}_2$  en aguas marino – costeras” REMARCO-AO-P-01 ubicado en <https://remarco.org/manual-ao/>
- Desde el recipiente que contiene la muestra, transferir a través de un tubo conductor (Tygon) un volumen adecuado de la misma hacia su cubeta de medición de manera que le permita el enjuague de la cubeta. Repetir el enjuague tres veces.
- Llenar la cubeta de medición permitiendo que el agua fluya suavemente en su interior evitando la formación y acumulación de burbujas. Sostenga la cubeta en posición vertical dejando el puerto conectado al tubo conductor en la posición inferior hasta que el agua desborde el puerto superior, gírela suavemente hasta alcanzar posición horizontal y

permita que el agua la desborde al menos por el equivalente de dos veces su volumen (dos veces el tiempo de llenado).

- d. Tapar el puerto libre de la cubeta evitando la formación de burbujas. Gírela suavemente de manera que el puerto conectado al tubo conductor quede en posición superior, retire suavemente el tubo conductor y coloque suavemente el tapón restante dejando una pequeña cámara de aire en el puerto de la cubeta (~ 5 mm).

**Nota 3:** La pequeña cámara de aire evita la ruptura de la cubeta por sobrepresión durante el proceso de tapado de la misma y a la vez proporciona espacio adecuado para alojar el volumen de indicador que será añadido (Berghoff, 2020).

**Nota 4:** De tener disponibles suficientes cubetas, prepare en este momento al menos tres cubetas (réplicas).

#### 6.5 Preparación de las condiciones para la medición

- a. Ajustar la temperatura de las muestras a 25 °C colocando las cubetas en bolsas Ziploc (una por bolsa) e introduciéndolas en un baño con temperatura controlada durante una hora antes de la medición.
- b. Ajustar la temperatura del área de medición a 25 °C.
- c. Encender el baño termostático con recirculación para aclimatar el porta cubetas haciendo circular agua a 25 °C a través del mismo. Ejecutar esta operación al menos 30 minutos antes de la medición.
- d. Encender la lámpara de la fuente de luz. Ejecutar esta operación al menos 30 minutos antes de la medición.
- e. Encender el computador previamente acoplado al espectrofotómetro e iniciar el software Ocean View.

#### 6.6 Comprobación del pH de la solución indicadora

Comprobar que la solución indicadora de mCP se encuentre en el rango de pH comprendido entre 7.8 - 8.0. Utilizar para ello un pH-metro previamente ajustado en escala NBS.

#### 6.7 Configuración del modo de operación del espectrofotómetro.

- a. Tomar una cubeta del baño y secarla suavemente con papel libre de fibras asegurándose de que no quedan gotas que impidan el paso de la luz.
- b. Colocar la cubeta en el porta cubetas. La misma debe posicionarse siempre de la misma manera durante el análisis: la marca "OS100 mm" cara a usted y los puertos en posición vertical. El lado izquierdo de la cubeta debe tocar la pared del porta cubetas (la luz entra al detector por ese lado). Ajustar la palanca para el bloqueo del haz de luz de manera que permita el paso de la luz hacia el interior. Finalmente colocar la tapa del porta cubetas asegurándose que cae en su posición (Figura 1).

**Nota 5:** Durante el análisis es importante mantener de manera consistente la posición de la celda en el porta celdas.

- c. En el software Ocean View. En la ventana flotante de bienvenida "Welcome Screen" seleccionar la opción "Spectroscopy Application Wizard" (Figura 2).
- d. Aparecerá la ventana de las aplicaciones espectrofotométricas disponibles. Seleccionar la

opción “Absorbance”, seguidamente seleccionar “Absorbance only”, y finalmente pulsar “Next” (Figura 2).



Figura 2: Vista de la ventanas de inicio (izquierda) y aplicaciones espectrofotométricas (derecha) del software Ocean View

- e. Aparecerá la ventana de configuración de los parámetros de adquisición, “Set Acquisition Parameters”. Configurar los parámetros en la pestaña “Main Controls”. Al finalizar pulse “Next” (Figura 3).
- ✓ Tiempo de integración (“Integration time”): Ajustar manualmente o pulsando la opción “Automatic” de manera que el máximo de la curva cubra entre el 80-90 % del área por debajo de la línea azul. La unidad debe estar en ms.
- ✓ Promedio de adquisiciones espectrales (“Scans to average”): Establecer un valor de manera que multiplicado por el valor establecido en la opción “Integration time” el resultado sea aproximadamente 1000.
- ✓ Ancho de suavizado (“Box card”): Establecer el valor 5. El valor de ancho de suavizado debe ser aproximadamente el mismo valor que la resolución en píxeles del espectrómetro para suavizar los datos sin afectar la resolución espectral.
- ✓ Marcar las opciones “Electrical dark” y “Nonlinearity correction”.
- ✓ Modo de activación (“Trigger Mode”): Seleccionar “On Demand”. Permitirá que el espectrofotómetro adquiera los espectros basados en la configuración de los parámetros de adquisición.

**Nota 6:** Posterior a la configuración el botón indicador del estado de saturación de luz del espectrofotómetro adquiere color verde indicando que el espectrofotómetro no está saturado.

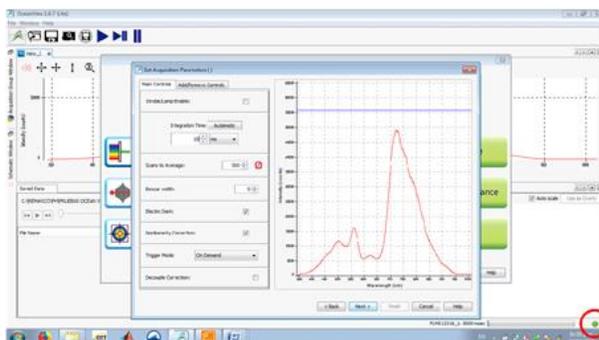


Figura 3. Vista de la ventana de configuración de los parámetros de adquisición del software.

- f. Aparecerá la ventana “Store Reference Spectrum”. Pulsar el icono que representa una bombilla amarilla para almacenar la vista previa del espectro de referencia, seguidamente pulsar “Next” (Figura 4).

**Nota 7:** En la vista “Live Adquisition” debe observarse una curva con intensidades entre el 80-90% del valor máximo del gráfico. Este espectro se actualizará con cada lectura de las muestras.

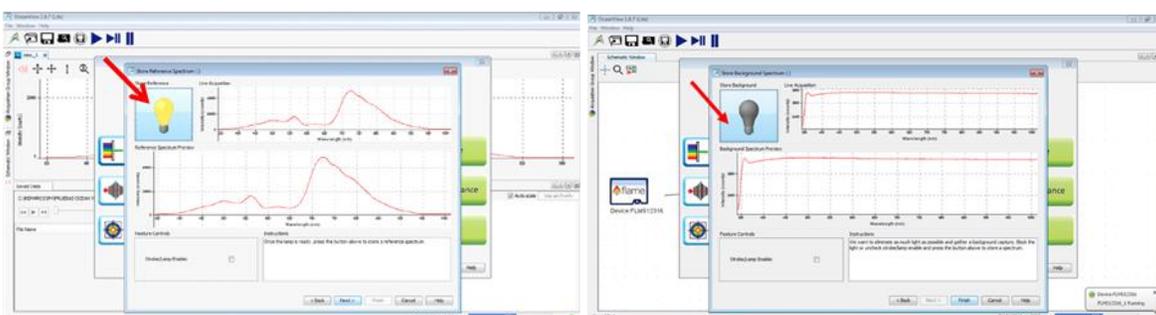


Figura 4. Vista de las ventanas de almacenamiento de los espectros de referencia (izquierda) y fondo (derecha)

- g. Aparecerá la ventana “Store Background Spectrum”. Retirar la tapa del porta cubetas, ajustar la palanca para el bloqueo del haz de luz de manera que bloquee el paso de la luz hacia el interior (NO apague la lámpara) y volver a colocar la tapa.
- h. Pulse el icono que representa una bombilla oscura para obtener una vista previa del espectro y seguidamente pulse “Finish” (Figura. 4).

**Nota 8:** Este espectro lo usará el software Ocean View para el cálculo de la absorbancia. Su función es eliminar todas las fuentes de luz externas a la lámpara. No es necesario su registro en todas las muestras analizadas, sin embargo, en el caso de pasar varias horas entre un análisis y otro debe registrarse nuevamente (Berghoff, 2020).

**Nota 9:** Al lado de la pestaña “View\_#” aparecerá la pestaña “AbsorbanceView\_#”, esta será la que se utilizará para realizar las determinaciones de la absorbancia.

- i. En la pestaña “View\_#”, seleccionar el icono “Configure graph saving”. Aparecerá la ventana “Algorithm Parameters Control”. Configurar los parámetros de la siguiente forma (Figura 5, izquierda).

En la sección opciones de fichero (“File Options”) seleccionar:

- ✓ Formato de fichero (“File Format.”): “ASCII with header data”
- ✓ Directorio (“Target Directory.”): directorio en el que se guardará el fichero (datos del espectro).

En la sección nombre del fichero “Filename Decoration”

- Nombre (“BaseName”): Posteriormente en el momento que se registrará el espectro se indicará el nombre del mismo, esta información se actualizará para cada medición.

En la sección “File Suffix” seleccionar

- ✓ “Timestamp”: marcar esta opción

En la sección opciones de guardado (“Save Options”) seleccionar:

- ✓ Guardar cada escaneo (“Save every scan.”): Marcar esta opción.
- ✓ Configurar para guardar al menos 10 espectros. Desmarcar “Stop after this many scan”, marcar la opción “Stop after this amount of time” y configurar el tiempo que permanecerá el espectrofotómetro guardando los espectros. La cantidad de espectros guardados dependerá de la configuración en los parámetros de adquisición.

**Nota 10:** Para guardar solo un espectro seleccionar “Stop after this many scan” y configurar en 1.

- ✓ Pulsar “Apply” y luego “Exit”

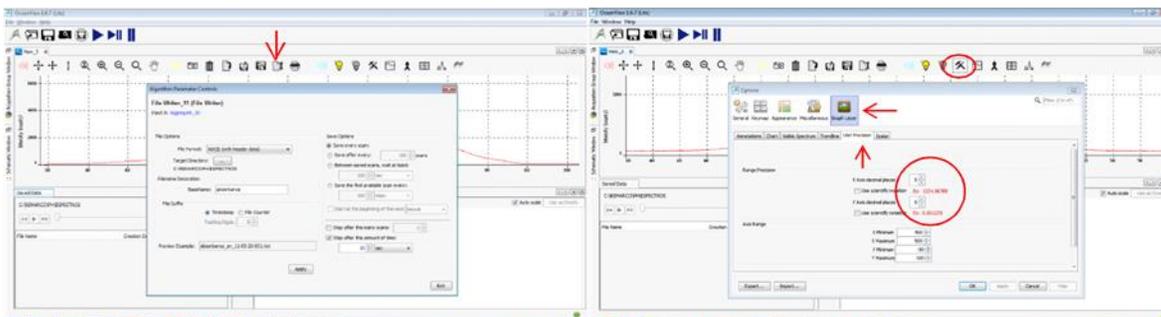


Figura 5. Vista de las ventanas “Algorithm Parameter Control” (izquierda) y “Options” del software Ocean View

- En la pestaña “View\_#”, seleccionar el icono “Set graph layer options”. Aparecerá la ventana “Option”. Figura 5 (derecha).
  - ✓ En la opción “Graph Layer” seleccionar la pestaña “Unit Precision”.
  - ✓ En la sección “Range Precision” configurar a 6 los lugares decimales en los ejes X y Y.
  - ✓ Pulse “Apply” y luego “OK”.
- 7.7.11. Retirar la tapa del porta cubetas, ajustar la palanca para el bloqueo del haz de luz de manera que permita el paso de la luz hacia el interior y colocar nuevamente la cubeta en el baño para mantenerla a la temperatura adecuada.

## 6.8 Medición de la absorbancia de la muestra.

Para cada muestra se realizarán tres mediciones de absorbancia siguiendo la siguiente secuencia:

- Medir el espectro de absorbancia en la muestra de agua de mar sin adición de indicador (blanco).
- Medir el espectro de absorbancia en la muestra de agua de mar tras la primera adición de indicador (blanco + 1mCP).
- Medir el espectro de absorbancia en la muestra de agua de mar tras la segunda adición de indicador (blanco + 2mCP).



Secuencia para la muestra de agua de mar sin adición de indicador (blanco):

- a. Configurar la ruta y crear el directorio donde se almacenarán los espectros. En este directorio se almacenarán todos los espectros (blanco, blanco + 1mCP y blanco + 2mCP) pertenecientes a la muestra en análisis.
- b. Configurar el nombre del espectro.
- c. Guardar el espectro en el directorio designado.
- d. Almacenar el espectro en el software (espectro de referencia). Esto permitirá la corrección automática de la absorbancia en las muestras tras la adición de indicador.
- e. Medir la temperatura

Secuencia para las muestras de agua de mar tras las adiciones sucesivas de indicador (blanco + 1mCP y blanco + 2mCP):

- a. Configurar el nombre del espectro.
- b. Adicionar el indicador.
- c. Guardar el espectro en el directorio designado.
- d. Medir la temperatura.

#### 6.8.1 *Medición de la absorbancia en la muestra de agua de mar sin indicador*

- a. Tomar una nueva cubeta del baño y secarla suavemente, asegurándose de que no queden gotas que impidan el paso de la luz. Colocarla en el porta cubetas, verificar su posición y volver a colocar la tapa del porta cubetas. Esperar unos segundos para que se estabilice el espectro.

**Nota 11:** Durante el análisis es importante mantener de manera consistente la posición de la cubeta en el porta cubetas.

- b. En la pestaña “AbsorbanceView\_#” seleccionar el icono “Configure graph saving”. Aparecerá la ventana “Algorithm Parameters Control”.
- c. En la sección Directorio (“Target Directory:”): Crear o seleccionar el directorio donde se guardarán los espectros. Establecer un nombre que le permita la identificación inequívoca de su contenido. Por ejemplo “Código de la estación-fecha de muestreo” (e.g. RL-30072020).
- d. En la sección nombre del fichero “Filename Decoration”: Nombrar el fichero de la muestra. Para la muestra de agua de mar sin indicador (blanco). Puede nombrar el fichero de la siguiente manera “Código muestra-BLANCO” (e.g RL24072020-BLANCO).
- e. Fijar el seleccionador de longitudes de onda en 730 nm y anotar el valor de absorbancia correspondiente, para ello haga clic izquierdo en el gráfico del espectro. Este valor lo comparará posteriormente con el valor que obtendrá cuando mida la absorbancia a 730 nm de la muestra con el indicador (Figura 6).
- f. Guardar el espectro. Haga clic en el icono “save graph to file”. El icono toma color rojo mientras se guarda el espectro. Compruebe la existencia de archivo txt en el directorio previamente creado.

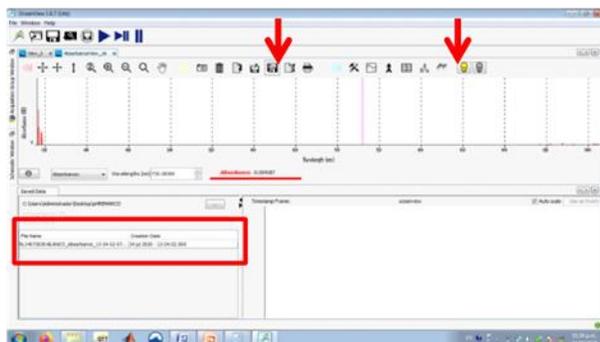


Figura 6. Vista de la pestaña "AbsorbanceView\_#" con el espectro de la muestra sin indicador.

- g. Almacenar el espectro en el software, para ello pulsar el icono que representa una bombilla amarilla. El software automáticamente restará el espectro cuando sea leída la muestra con indicador. Este espectro se almacenará en cada ocasión que se analice una muestra o réplica (Figura 6).
- h. Retirar la tapa del porta cubetas. Retirar una de las tapas de la cubeta. Medir y registrar el valor de la temperatura.

#### 6.8.2 Medición de la absorbancia en la muestra de agua de mar tras la primera adición de indicador (blanco + 1mCP).

- a. Pipetear 50  $\mu$ L de indicador mCP. Verificar que no queden burbujas.
- b. Agregar los 50  $\mu$ L de indicador a la muestra. Tapar la cubeta y girarla suavemente de derecha a izquierda sin crear burbujas. Asegurarse de que todo el indicador se haya disuelto y que el color sea homogéneo.
- c. Limpiar el exterior de la cubeta con papel libre de fibras. Colocar la cubeta en el porta cubetas y verificar su posición. Colocar la tapa de la cámara de medición. Esperar unos segundos para que se estabilice el espectro.

**Nota 12:** Verificar que los valores de absorbancia para las longitudes de onda de 578 y 434 nm estén en el rango entre 0.4 y 1.0 (Dickson et al., 2007; Rérolle et al., 2012). Verificar que la diferencia en la absorbancia a 730 nm respecto al espectro de referencia sea menor o igual a  $\pm 0.001$ . Caso contrario remover la cubeta y limpiar bien las ventanas ópticas (Figura 7).

- d. Configurar el nombre del espectro. Pulsar el icono "Configure graph saving". Para la muestra de blanco + 1mCP puede nombrar el fichero de la siguiente manera: "Código muestra-1mCP" (e.g RL24072020-1mCP).
- e. Guardar el espectro. Hacer clic en el icono "save graph to file".

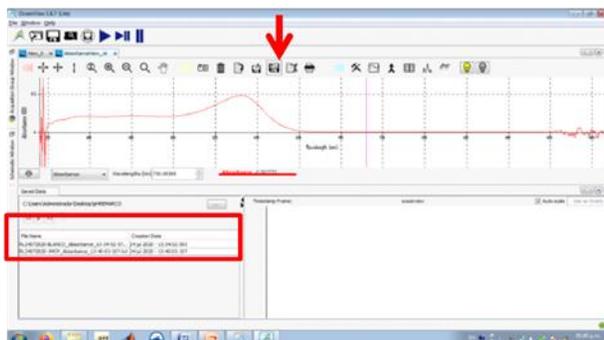


Figura 7. Vista de la pestaña "AbsorbanceView\_#" del software Ocean View

- f. Retirar la tapa del porta cubetas, retirar suavemente una de las tapas de la cubeta, medir la temperatura de la muestra y anotarla.
- 6.8.3 *Medición de la absorbancia en la muestra de agua de mar tras la segunda adición de indicador (blanco + 2mCP)*
- a. Pipetear otros 50  $\mu\text{L}$  de indicador mCP y agregarlos a la cubeta. Volver a taparla, tomarla cuidadosamente y girarla suavemente de derecha a izquierda sin crear burbujas. Asegurarse de que todo el indicador se haya disuelto y que el color sea homogéneo.
  - b. Repetir los pasos del 7.8.2.3. al 7.8.2.6. Para la muestra con la segunda adición de mCP nombrar el fichero "Código muestra-2mCP" (e.g RL24072020-2mCP).
- 6.9 Registro de datos.
- a. Anotar en el registro primario los datos relacionados con:
    - ✓ Código de la muestra.
    - ✓ Dirección del directorio donde fueron guardados los espectros de absorbancia.
    - ✓ Características del indicador añadido: peso molecular, pureza, fabricante, lote.
    - ✓ Características de la solución del indicador: concentración, pH, matriz de disolución (e.g agua tipo I).
    - ✓ Temperatura de la muestra a la que fue medida la absorbancia durante la medición del blanco, de la primera y la segunda adición del indicador mCP.
    - ✓ Salinidad de la muestra.
    - ✓ Analista.
  - b. Guardar una copia digital de seguridad de los espectros de absorbancia y la información generada en el apartado anterior.
- 6.10 Cálculo y expresión de los resultados
- 6.10.1 *Cálculo del pH*

Para el cálculo del pH a partir de la constante de disociación ácida del indicador mCP ( $K_2$ ), los coeficientes de extinción del mCP ( $\epsilon$ ) y el cociente de las absorbancias ( $R$ ) se utilizará la expresión descrita por Liu et al. (2011) en la cual las características físico-químicas del mCP han sido

caracterizadas para un rango de temperaturas entre 5 0C y 35 0C y de salinidad entre 20 y 40, más apropiadas a las condiciones costeras habituales en las zonas de estudio de los investigadores de REMARCO.

$$pH_T = -\log_{10}(K_2^T e_2) + \left( \frac{R - e_1}{1 - R * e_3 / e_2} \right) \quad (4)$$

Donde:

La constante de disociación ácida del indicador mCP se formula como:

$$-\log_{10}(K_2^T e_2) = a + \frac{b}{T} + c * \ln T - d * T \quad (5)$$

$$a = -246.64209 + 0.315971 * S + 2.8855 * 10^{-4} * S^2 \quad (6)$$

$$b = 7229.23864 - 7.098137 * S - 0.057034 * S^2 \quad (7)$$

$$c = 44.493382 - 0.052711 * S \quad (8)$$

$$d = 0.0781344 \quad (9)$$

Los coeficientes de extinción del mCP se formulan como:

$$e_1 = -0.007762 + 4.5174 * 10^{-5} * T \quad (10)$$

$$\frac{e_3}{e_2} = -0.020813 + 2.60262 * 10^{-4} * T + 1.0436 * 10^{-4} * T * (S - 35) \quad (11)$$

El cociente de las absorbancias (R) entre las absorbancias medidas a las longitudes de onda 578 nm y 434 nm determinadas en las muestras previo a la adición del indicador mCP ( $A_{\lambda,b}$ ) y posterior a su adición ( $A_{\lambda,mCP}$ ) se formula como:

$$R = \frac{(A_{578,mCP} - A_{578,b}) - (A_{730,mCP} - A_{730,b})}{(A_{434,mCP} - A_{434,b}) - (A_{730,mCP} - A_{730,b})} \quad (12)$$

La absorbancia en la longitud de onda no absorbida por el indicador (730 nm) permite corregir cambios de línea de base debido a un error en el reposicionamiento de la celda, ruido electrónico, entre otros.

#### 6.10.2 Corrección de la perturbación del pH provocada por adición del indicador.

La adición de indicador mCP (ácido débil) a la muestra altera el pH de la misma. El efecto de la perturbación provocada es diferente para las muestras de agua con diferentes valores de salinidad, alcalinidad total y pH, y su magnitud es menor cuando los valores de estas variables son similares entre la muestra y el indicador (Li et al., 2020).

Se ha estimado que la perturbación es < 0.001 unidades de pH cuando la fuerza iónica entre la solución indicadora y del agua es similar, la diferencia de pH entre ellas es < 0.3 (Chierici et al.,

1999) y la alcalinidad total del agua es  $> 2000 \mu\text{molkg}^{-1}$  (Li et al., 2020).

La magnitud de la perturbación es proporcional al paso de luz de las cubetas de medición. Se requiere una mayor concentración de indicador en cubetas de 1 cm y 5 cm para alcanzar absorbancias comparables a la obtenida en cubetas de 10 cm; por esta razón las cubetas de 10 cm minimizan la cantidad de indicador añadido, y por tanto de la perturbación.

La magnitud de la perturbación puede ser determinada por el método empírico (Clayton and Byrne, 1993; Dickson et al., 2007), que consiste en la adición secuencial (dos adiciones) de indicador a la muestra y su extrapolación a cero adiciones de indicador con el objetivo de determinar el valor del cociente de absorbancia corregido ( $R_{\text{corr}}$ ) para cero adición de indicador. Para ello se calcula el cociente de absorbancias  $R$  (ecuación 12) para cada uno de los dos volúmenes de indicador añadido obteniéndose dos puntos ( $R_{1\text{mCP}}, V_1$ ), ( $R_{2\text{mCP}}, V_2$ ) donde la ordenada en el origen ( $V=0$ , no adición de indicador) (ecuación 14) es:

$$R = R_{1\text{mCP}} + \frac{R_{2\text{mCP}} - R_{1\text{mCP}}}{V_2 - V_1} * (V - V_1) \quad (13)$$

$$R_{\text{corr}} = R_{1\text{mCP}} - \frac{R_{2\text{mCP}} - R_{1\text{mCP}}}{V_2 - V_1} * V_1 \quad (14)$$

La ecuación 14 puede ser aplicada a cada muestra para muestras de salinidades bajas (Lai et al., 2016) o cuando se disponga de un número limitado de muestras de agua de mar y el rango de salinidad, pH y alcalinidad de ellas sean similares (Li et al., 2020).

Cuando el set de muestras en análisis es numeroso y/o comprende un amplio rango de salinidades, pH y alcalinidad total, la doble adición se puede realizar en un número seleccionado de muestras que comprendan el rango de estas variables. En cada muestra seleccionada, se calcula el cambio  $\Delta R/\Delta V$  (ecuación 15) provocado por la adición sucesiva de indicador. Con el conjunto de puntos ( $R_{1\text{mCP}}, \Delta R/\Delta V$ ) se calcula el cambio  $\Delta R/\Delta V$  como una función lineal de  $R_{1\text{mCP}}$  (ecuación 16). El valor de la ordenada al origen (a) y pendiente (b) de la recta de regresión resultante permiten calcular un valor de  $R$  corregido (ecuación 17) para cero adición de indicador aplicado a cada muestra del set en análisis.

$$\frac{\Delta R}{\Delta V} = \frac{R_{2\text{mCP}} - R_{1\text{mCP}}}{V_2 - V_1} \quad (15)$$

$$\frac{\Delta R}{\Delta V} = a + b * R_{1\text{mCP}} \quad (16)$$

$$R_{\text{corr}} = R_{1\text{mCP}} - (a + b * R_{1\text{mCP}}) * V_1 \quad (17)$$

Una vez determinado el valor de  $R_{\text{corr}}$  (ecuación 14 ó ecuación 17) este se utiliza en la ecuación (4) cuyo resultado representará el pH sin el efecto de la perturbación calculado a la temperatura de medición.

Para calcular el pH a la temperatura en el momento de la colecta puede utilizar un programa de libre acceso como por ejemplo R (paquete: seacarb, función: pHinsi) o el CO2SYS. Para el cálculo

remítase a REMARCO-AO-P-08.

### 6.10.3 Fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre en la determinación espectrofotométrica del pH utilizando mCP como indicador incluyen factores relacionados con la calidad de los instrumentos (precisión en las longitudes de onda y absorbancia, control de la temperatura y volumen) y las características fisicoquímicas del indicador (pureza, errores en la determinación del  $pK_2$ , incertidumbre de los coeficientes de extinción, perturbación por adición de indicador). DeGrandpre et al. (2014) identifican a los errores instrumentales asociados con el espectrofotómetro y la pureza del indicador mCP como las fuentes primarias de incertidumbre en las determinaciones espectrofotométricas de pH. La incertidumbre general se determina por la combinación de las fuentes individuales de incertidumbre a través de la propagación de los errores de cada una de las fuentes (Ellison y Williams, 2012). Para su determinación remítase al procedimiento de estimación de incertidumbre REMARCO-AO-P-07.

En la documentación asociada al procedimiento REMARCO-AO-P-07 se facilitan la plantilla Excel y el script en el software libre R para el cálculo del valor del pH siguiendo las formulaciones descritas en los epígrafes 7.10.1 y 7.10.2 y su incertidumbre asociada.

## 7 CONTROL DE CALIDAD

- a. Mantener un registro detallado de la metodología utilizada y los resultados
  - ✓ Datos primarios de las absorbancias medidas.
  - ✓ Datos del indicador: peso molecular, pureza, suministrador, lote.
  - ✓ Características de la matriz de disolución en que fue preparado el indicador (p.e: agua tipo I, Solución salina ( $0.7 \text{ mol kg}^{-1}$  de NaCl)).
  - ✓ Concentración y pH de la solución indicadora.
  - ✓ Volumen de indicador añadido para la determinación.
  - ✓ Algoritmo para calcular la magnitud de la perturbación provocada por adición de indicador.
  - ✓ Magnitud de la perturbación.
  - ✓ Si se tiene suficiente información, consistencia de los valores de pH medidos con el derivado utilizando otro par de variables del sistema de los carbonatos.
  - ✓ Valores atípicos observados.
  - ✓ En caso de utilizar indicador impuro, indicar si se ha aplicado corrección (Douglas and Byrne, 2017).
  - ✓ Documentos del sistema de control de la calidad.
- b. Para determinar la precisión de la medición de pH: el resultado de las muestras duplicadas provenientes de una misma botella debe ser ploteado en un gráfico de control. Se espera una desviación estándar menor que 0,01.
- c. La veracidad de las mediciones espectrofotométricas de pH es más difícil de determinar. La veracidad del método depende de la veracidad con lo que fue determinada la constante de disociación del indicador ( $pK_2$ ) y sus coeficientes de extinción molar, la veracidad de la temperatura, la salinidad, así como de la calibración y sensibilidad del espectrofotómetro. Para evaluar la veracidad del método se realizará medición de pH al buffer Tris (SCRIPPS Institute) a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y el valor medido se comparará con el valor teórico del Tris, el cual tiene una incertidumbre de 0.005 (DelValls and Dickson, 1998). La diferencia

entre el valor medido y el valor certificado se ploteará en un gráfico de control. Las mediciones del Tris buffer también se utilizan para comprobar la calidad de la solución indicadora de mCP.

- d. Para determinar el desempeño del espectrofotómetro (estabilidad) se realizarán una serie de mediciones repetidas a un sistema de absorbancia constante (p.e. SRM930d o una solución de buffer con indicador adicionado y acondicionada a 25 °C). Las desviaciones estándar de las longitudes de onda (434-578-730) serán ploteadas en gráfico de control.

## 8 MANEJO DE RESIDUOS

El presente método genera residuos ácidos con contenido de mercurio. Estos residuos se almacenan en recipientes adecuados protegidos de la corrosión (plástico o vidrio), rotulados según la clasificación interna de RESPEL del laboratorio y ubicarlos en el sitio de disposición temporal del laboratorio, para posteriormente entregarlos a una compañía especializada para su tratamiento.

Llevar el control de generación de residuos.

## 9 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Berghoff CF.: Procedimiento de determinación espectrofotométrica del pH de agua de mar con púrpura de meta-creso, Informe de Asesoramiento y Transferencia. Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Argentina, 17 pp., 2020

Bockmon, E. E. and Dickson, A. G.: A seawater filtration method suitable for total dissolved inorganic carbon and pH analyses, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 12, 191–195 [online] Available from: <http://scrippsolars.ucsd.edu/adickson/content/seawater-filtration-method-suitable-total-dissolved-inorganic-carbon-and-ph-analyses>, 2014.

Carter, B. R., Radich, J. A., Doyle, H. L. and Dickson, A. G.: An automated system for spectrophotometric seawater pH, *Limnol. Oceanogr. METHODS*, 11, 16–27, doi:10.4319/lom.2013.11.16, 2013.

Chierici, M., Fransson, A. and Anderson, L. G.: Influence of m-cresol purple indicator additions on the pH of seawater samples: Correction factors evaluated from a chemical speciation model, *Mar. Chem.*, 65(3-4), 281–290, doi:10.1016/S0304-4203(99)00020-1, 1999.

Chou WC, Gong GC, Yang CY, Chuang KY.: A comparison between field and laboratory pH measurements for seawater on the East China Sea shelf. *Limnology and Oceanography, Methods* 14: 315-322, 2016

Clayton, T. D. and Byrne, R. H.: Spectrophotometric seawater pH measurements : total hydrogen results, *Deep. Res. I*, 40(10), 2115–2129, 1993.

DeGrandpre, M. D., Spaulding, R. S., Newton, J. O., Jaqueth, E. J., Hamblock, S. E., Umansky, A. A. and Harris, K. E.: Considerations for the measurement of spectrophotometric pH for ocean acidification and other studies, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 12(DEC), 830–839, doi:10.4319/lom.2014.12.830, 2014.

DelValls, T. A. and Dickson, A. G.: The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ('tris') in synthetic sea water, *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.*, 45(9), 1541–1554, doi:10.1016/S0967-0637(98)00019-3, 1998.

Dickson, A. G., Sabine, C. L. and Christian, J. R.: Guide to best practices for ocean CO<sub>2</sub> measurements, PICES Spec. Publ. 3, 3(8), 191, doi:10.1159/000331784, 2007.

Douglas, N. K. and Byrne, R. H.: Spectrophotometric pH measurements from river to sea: Calibration of mCP for  $0 \leq S \leq 40$  and  $278.15 \leq T \leq 308.15K$ , Mar. Chem., 197, 64–69, doi:10.1016/j.marchem.2017.10.001, 2017.

Ellison, S. L. . and Williams, A.: Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edit., 2012.

GOA-ON: GOA-ON in a Box SOP3: Determination of the pH of sea water using the indicator dye m-cresol purple, [online] Available from: <http://www.goa-on.org/resources/kits.php>, n.d.

Intergovernmental Oceanographic Commission (of UNESCO). Indicator Methodology for 14.3.1, IOC/EC-LI/2 Annex 6. Fifty-first Session of the Executive Council UNESCO, Paris, 17 pp, 3-6 July 2018

Lai, C. Z., DeGrandpre, M. D., Wasser, B. D., Brandon, T. A., Clucas, D. S., Jaqueth, E. J., Benson, Z. D., Beatty, C. M. and Spaulding, R. S.: Spectrophotometric measurement of freshwater pH with purified meta-cresol purple and phenol red, Limnol. Oceanogr. Methods, 14(12), 864–873, doi:10.1002/lom3.10137, 2016.

Li, X., García-ibáñez, M. I., Carter, B. R., Li, Q., Easley, R. A. and Cai, W.: Purified meta-cresol purple dye perturbation: How it influences spectrophotometric pH measurements, Mar. Chem., 103849, doi:10.1016/j.marchem.2020.103849, 2020.

Liu, X., Patsavas, M. C. and Byrne, R. H.: Purification and characterization of meta-cresol purple for spectrophotometric seawater ph measurements, Environ. Sci. Technol., 45(11), 4862–4868, doi:10.1021/es200665d, 2011.

OCEAN OPTICS: OceanView Installation and Operation Manual. Document: 000-20000-310-02-201602c., 2013.

OCEAN OPTICS: Flame Miniature Spectrometer. User Manual. Document: 225-00000-000-11-201604., 2015.

Patsavas M., Byrne R. and Liu X., (2013), “Purification of meta-cresol purple and cresol red by flash chromatography: Procedures for ensuring accurate spectrophotometric seawater pH measurements”, *Marine Chemistry*, 150, 19-24, DOI: 10.1016/j.marchem.2013.01.004.

Pimenta A.R, Grear J.S.: EPA Guidelines for measuring changes in seawater pH and associated carbonate chemistry in coastal environments of the Eastern United States. Office of Research and Development, National Health and Environmental Effects Research Laboratory. EPA/600/R-17/483, 56 pp, 2018

Rérolle, V. M. C., Floquet, C. F. A., Mowlem, M. C., Connelly, D. P., Achterberg, E. P. and Bellerby, R. R. G. J.: Seawater-pH measurements for ocean-acidification observations, TrAC - Trends Anal. Chem., 40, 146–157, doi:10.1016/j.trac.2012.07.016, 2012.