

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DETERMINACION DE COMPUESTOS CLOROFENOLICOS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y LIQUIDOS
EN AGUAS DE DESECHO DE LA INDUSTRIA PAPELERA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:
MARIA DOLORES CAMPOS VELARDE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

FEBRERO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7
29



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Q.F.B. Elvira Ríos Leal.

La asesoría en la FES-Zaragoza estuvo a cargo del Q.F.B. César Escamilla Flores.

Parte del trabajo se presentó en el V Congreso Nacional de Biotecnología (Puerto Vallarta, México).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Q.F.B. Elvira Ríos Leal y al Q.F.B. César Escamilla Flores por la dirección del trabajo y todo su apoyo.

Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Refugio Rodríguez Vásquez por su colaboración y apoyo para la realización de éste trabajo.

A los miembros del laboratorio de cromatografía:

Ing. Cirino Rojas Chávez
Q.F.B. Francisco Rangel Camargo
Técnico en Investigación Vinicio A. Mena V.

Por su apoyo técnico y valiosa amistad.

A la Q.F.B. Adriana Bañuelos P. y M.en C. Magdalena Ibarra Z. por proporcionar algunas muestras que fueron necesarias para la realización de este trabajo y por su amistad.

Al Q.F.B. Miguel Gama Goicochea por el todo el apoyo brindado en la parte de espectroscopía de IR, RMN (Departamento de Química CINVESTAV-I.P.N.) y por su compañía.

A la empresa Kimberly-Clark de México planta Orizaba por su excelente colaboración.

A mis amigas Consuelo Santoyo y Blanca R. Arizona por su amistad y apoyo en todo momento.

A mis Padres por su comprensión, apoyo y enseñanzas.

ESTE TRABAJO LO DEDICO CON TODO CARIÑO A:

Mis Padres:

**Rebeca Velarde Morales
Ildefonso Campos Padrón**

Mis Hermanos:

Ildefonso, Aurora, Juan y Angeles.

Mis Abuelas:

**Aurora Padrón
y
Salud Morales**

También a:

Rebeca Peña, Angeles Benitez, Juan Benitez y Miguel Gama.

CONTENIDO

INTRODUCCION

1. FUNDAMENTACION	1
1.1. Generalidades	1
1.1.1. Compuestos Clorofenólicos	1
1.1.2. Cromatografía	6
1.1.3. Validación	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. OBJETIVOS	15
4. HIPOTESIS	15
5. PARTE EXPERIMENTAL	16
6. DISCUSION DE RESULTADOS	20
6.1. Variaciones del producto final obtenido por diferentes métodos de derivatización	20
6.2. Muestras de licores que recibieron tratamiento con microorganismos	20
6.3. Empleo de diferentes columnas cromatográficas	20
6.4. CLAR	22
7. CONCLUSIONES	36
8. SUGERENCIAS	38
9. ANEXO	39
ABREVIATURAS	46
10. BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION

Este trabajo reporta diferentes metodologías cromatográficas (gases y líquidos) para la determinación de compuestos Clorofenólicos, los que por su toxicidad están considerados como prioritarios. Se seleccionó aquella metodología que por sus características ofrece más ventajas (facilidad, rapidez) y se procedió a la validación.

Para el caso de los análisis realizados en cromatografía de gases se empleo la formación de un compuesto derivado, en este caso la formación de cloroacetatos, el detector empleado fue captura de electrones.

En los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) las muestras no se derivaron, se realizó una extracción líquido-líquido.

El detector que se empleado fue de UV con arreglo de diodos; se trabajó con gradiente de elución.

Se realizaron análisis cromatográficos de efluentes generados por una fábrica de papel; se pudieron identificar y cuantificar compuestos de tipo clorofenólico, m-clorofenol (0.64ppm) y 2,4,6-triclorofenol (0.062ppm).

Otro aspecto importante que se reporta en este trabajo es el análisis por cromatografía de gases de muestras reales que fueron tratadas con dos tipos de microorganismos, por un lado el hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* y por otro la bacteria *Pseudomona sp. RA2*

1. FUNDAMENTACION

1.1. Generalidades

Los compuestos Clorofenólicos son introducidos al medio ambiente en varias formas: a través de descargas de efluentes de la industria petroquímica y papelera y como productos de transformación, provenientes de químicos naturales y sintéticos; estos compuestos son tóxicos y le proporcionan un color y un sabor desagradable a las aguas, por ello es necesario establecer los niveles de concentración con la finalidad de implementar las medidas necesarias para disminuir la carga de estos compuestos en los efluentes, para lo cual se han realizado diversos estudios acerca de su cuantificación y degradación. Uno de los métodos de degradación es mediante el empleo de cepas puras o mediante cultivos mixtos. Dentro de las cepas de microorganismos degradadores de clorofenoles se encuentran *Pseudomonas* sp. RA2 y *Pseudomonas putida* y el hongo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium*.

Los compuestos Clorofenólicos pueden ser cuantificados por medio de cromatografía de gases o bien cromatografía de líquidos, la primera ofrece como ventaja que al emplear un detector de captura de electrones se logra buena sensibilidad y especificidad, por otro lado la cromatografía de líquidos ofrece análisis más sencillos con lo cual se ahorran reactivos y tiempo.

Debido a que los compuestos Clorofenólicos no poseen las características adecuadas para ser analizados por cromatografía de gases (polaridad alta y presión de vapor baja) es necesario formar un derivado que cumpla con las condiciones requeridas (polaridad baja y presión de vapor alta). Existen varios métodos de derivatización, entre los cuales se pueden mencionar la formación de éteres, ésteres fosforados, acetatos, cloroacetatos y compuestos silanizados.

El análisis de éste grupo de compuestos por cromatografía líquida de alta resolución no requiere la formación de derivados, lo que se hace es extracción con solventes, posteriormente se concentran los extractos y si es necesario el concentrado se debe limpiar para evitar las posibles interferencias.

Por lo mencionado anteriormente se puede observar que el desarrollo e implementación de la técnica cromatográfica para la determinación de estos compuestos contaminantes es muy importante y necesaria, sobre todo por la problemática ecológica actual.

1.1.1. Compuestos Clorofenólicos.

Propiedades.

Los llamados clorofenoles son compuestos orgánicos, sólidos a temperatura ambiente, excepto el o-clorofenol que es líquido. Presentan una solubilidad muy baja en agua, pero en forma de sales de sodio o potasio la aumentan. Su acidez aumenta con el número de cloros sustituidos.

Son posibles 19 isómeros, desde los monoclorofenoles (MCF) hasta el pentaclorofenol (figura 23 del anexo).

La Industria Papelera mexicana manufactura cerca de 700,000 toneladas de pulpa por año y 2,900,000 toneladas de papel por año. La mitad de la pulpa que se produce es obtenida por proceso Kraft y el 70 % de la mitad de esa pulpa Kraft es blanqueada mediante el uso de cloro y otros agentes blanqueadores.

La mitad de la madera se disuelve con sustancias químicas para producir celulosa; el ataque químico sobre las ligninas y hemicelulosas dan lugar a una gran variedad de compuestos orgánicos disueltos lo cual trae como consecuencia descargas de efluentes con alta carga de sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos, material orgánico coloidal y soluble degradable y persistente, sales solubles y compuestos tóxicos solubles como por ejemplo dioxinas cloradas, clorofenoles, compuestos derivados de resinas, taninos, sulfuros, etc. (Poggi, 1994).

En la figura 1. se muestra un esquema para la obtención de papel.

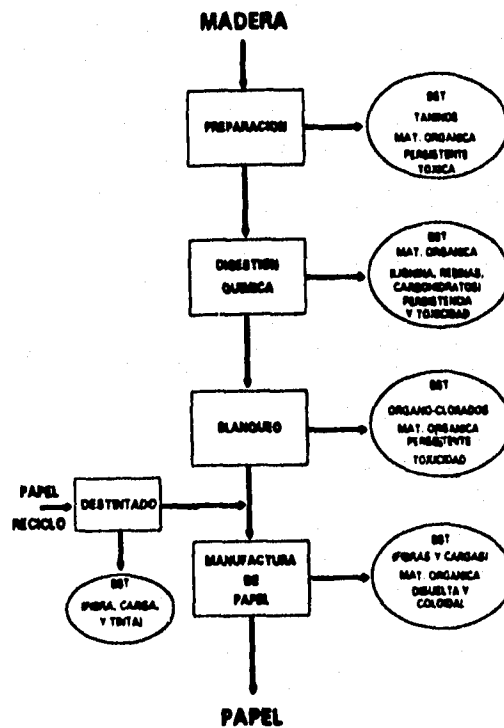


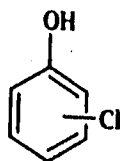
Figura 1. Esquema sobre la producción de Papel.

La adición de cloro en la etapa de blanqueo conduce a la formación de una gran variedad de compuestos orgánicos clorados en el licor de blanqueo, ya que el cloro reacciona específicamente con la lignina remanente (5-10 %) unida a la pulpa; entre los compuestos clorados se tienen a los clorofenoles (p-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol), cloroguaicoles (3,4,6-tricloroguaiacol, 3,4,5-tricloroguaiacol, 4,5,6-tricloroguaiacol y al tetracloroguaiacol), clorocatecoles y otras sustancias de peso molecular mayor a 1,000 dalton (Melcer, 1992); éstas sustancias son más tóxicas, más lipofílicas (más bioacumulables), menos biodegradables y más mutagénicas (Environment Canada/Santé et Bien-être social Canada, 1991); algunos de estos compuestos pueden degradarse lentamente hasta compuestos clorados más pequeños que son igualmente bioacumulables (Bergbauer, 1992).

A nivel celular los compuestos de tipo fenólico y clorofenólico actúan como desacopladores metabólicos, desconectan la fosforilación oxidativa del transporte de electrones, interfieren en la síntesis del ATP. Otra observación es que los compuestos fenólicos desnaturalizan proteínas y destruyen membranas celulares (Prescott et.al.1990).

Los compuestos fenólicos y sus derivados son compuestos constituidos fundamentalmente por un benceno sustituido en uno de sus carbonos por un radical hidroxilo. Puede a su vez existir una sustitución por halógenos como por ejemplo cloro. Los productos halogenados del fenol son empleados en la formulación de agentes desinfectantes (clorofenoles), pesticidas, fungicidas, herbicidas, aditivos para cosméticos, antisépticos, analgésicos, conservadores, etc.

Fórmula general:



Por sus cualidades particulares éste grupo de compuestos representan un peligro de toxicidad (en muchos países se les considera de atención prioritaria). Al encontrarse presentes le transmiten al medio en que se encuentran un sabor medicinal y olor desagradable a los alimentos o al agua. Los compuestos de tipo fenólico son generados en las industrias petroquímicas y papeleras, de esta manera por medio de sus efluentes es como las aguas naturales se contaminan, las concentraciones en las que se encuentran este tipo de contaminantes es en promedio de 75µg/L.

En cuanto a la degradación de este tipo de compuestos se tiene que es lenta para los más clorados y para el m-clorofenol. En general se pueden degradar por vía anaerobia y aerobia.

Los clorofenoles pueden generar por vía térmica y fotoquímica dioxinas cloradas o dibenzofuranos los cuales son compuestos sumamente tóxicos (C.Rappe, 1978).

Determinaciones Analíticas de Compuestos Fenólicos

■ Cromatografía de gases.

Un gran número de métodos analíticos han sido desarrollados para la determinación de clorofenoles en diferentes medios.

Existen algunos métodos ópticos que se emplean frecuentemente, estos se basan en la formación de compuestos coloridos por reacción con 4-aminopirina (M.C. Rand, 1976). Este método es muy sensible pero permite solamente la determinación de fenoles totales; los derivados p-sustituídos no reaccionan.

Los análisis de espectroscopía IR y de masas se emplean para la elucidación de estructuras y enlaces.

La cromatografía de papel y capa fina también se pueden aplicar en el análisis de estos compuestos ya que estos tienen la capacidad de absorber en UV y formar varios compuestos de tipo colorido; actualmente la cromatografía de gases y de líquidos son las metodologías más ampliamente utilizadas para la determinación de estos compuestos debido a que son metodologías rápidas y eficientes (E. Tesarova, 1983).

Debido a que los clorofenoles presentan bajas presiones de vapor y polaridades altas es necesario realizar reacciones de derivatización para poder realizar los análisis en cromatografía de gases. Al formar los derivados las temperaturas con las que se puede trabajar son más bajas y por consecuencia el número de fases estacionarias con las que se pueden hacer los análisis aumenta. Otra ventaja de la formación de derivados es que se obtienen mejores separaciones de los componentes y en cuanto a la parte de extracción de muestras acuosas la selectividad aumenta (R.T. Coutts, 1979).

En un detector de ionización de flama los análisis de muestras acuosas se pueden realizar, sin embargo la sensibilidad que se tiene es baja (ppm), este es otro punto a favor de la derivatización.

Existen varios derivados que se proponen para los análisis cromatográficos entre estos se encuentran: éteres etílicos y metílicos, acetatos o cloroacetatos, heptafluorobutiratos, derivados bromados, entre otros. En la formación de acetatos y cloroacetatos se reportan recobros de 80-100% y límites de detección de 1pg (W. Krijnsman, 1977).

Las derivatizaciones pueden presentar algunos inconvenientes:

- a) Puede existir una reacción incompleta del reactivo con el compuesto fenólico.
- b) Poca estabilidad del compuesto derivado.
- c) Algunos agentes empleados en las reacciones son tóxicos, carcinogénicos o explosivos.

Debido a las desventajas que presenta la formación de derivados se desarrollaron técnicas analíticas por CLAR con la ventaja de que no es necesario derivar.

Otra manera para analizar este tipo de compuestos es por medio de extracciones con solventes, este método funciona como un paso de preconcentración, es simple y rápido, sin embargo la desventaja que presenta es la posible extracción incompleta y la co-extracción de sustancias de interferencia. Se recomienda una doble extracción, primero con hexano para remover los compuestos de interferencia y después con benceno para extraer los fenólicos.

■ CLAR.

Las propiedades de polaridad y bajas presiones de vapor que presentan los compuestos clorofenólicos no tienen un efecto negativo en los análisis por CLAR.

CLAR puede ser aplicado para el análisis de mezclas complejas de compuestos fenólicos en muestras de agua. Puede emplearse en combinación con análisis en cromatografía de gases o cromatografía en capa fina.

Respecto a las fases estacionaria y móvil para estos análisis se tiene que el mecanismo que controla la separación es principalmente los enlaces de hidrógeno. La elución que se obtenga dependerá principalmente de las propiedades y posición de los sustituyentes.

La utilización de fases químicamente enlazadas en sistemas de fase reversa es el método más comúnmente empleado (cerca del 80% de los análisis). En tales sistemas la presencia del agua tiene poco efecto en la retención y el equilibrio de absorción es más rápido que con una fase estacionaria polar y un solvente no acuoso, esto es muy importante especialmente cuando se utiliza gradiente de elución.

El uso de ácido acético en la fase móvil presenta un efecto favorable en la separación de los clorofenoles, los tiempos de retención se acortan y se obtienen picos más simétricos (G. Kung-Jou Chao, 1981).

Las características de retención de los clorofenoles depende del número de átomos de cloro, a mayor cloración será mayor la retención. Con un número de átomos de cloro constante, la retención aumentará con el aumento del pK_a y disminuirá con el aumento del momento dipolar. El detector más comúnmente empleado en CLAR para la determinación de estos compuestos fenólicos es el de UV. El espectro de absorción de la mayoría de los compuestos fenólicos es entre 274 y 266nm.

Al igual que en CG se pueden formar derivados para mejorar la sensibilidad de la detección, ejemplo de ello es la formación de p-nitrozoderivados.

En el caso del análisis de muestras acuosas que contienen contaminantes de tipo fenólico, la CLAR puede ser una alternativa muy atractiva para su análisis. Las muestras pueden ser inyectadas de manera directa, se emplea generalmente un sistema en fase reversa. En el caso de concentraciones bajas de fenoles (ppb), se aplican métodos de enriquecimiento, por ejemplo adsorción sobre sílica gel o cartuchos de C_{18} , en combinación con fase móvil de acetonitrilo-agua. Cuando se tienen muestras complicadas de clorofenoles se recomienda el uso de gradientes de elución (P.A. Realini, 1981).

1.1.2. Cromatografía

La cromatografía se puede definir como un método de tipo físico - químico que se emplea en la separación de los componentes de una mezcla, actualmente es considerada como una técnica de análisis básica.

La separación se realiza entre dos fases, una fase móvil y una estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o bien un gas y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. La fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria. La fase estacionaria se encuentra contenida en una columna, dependiendo de su estructura adsorbe o absorbe los componentes de la mezcla que se desean separar.

El proceso de separación es considerado un proceso de partición entre las dos fases de los componentes a separar. Esta partición se realiza en forma diferencial para cada uno de los solutos, dependiendo de la solubilidad que estos presenten con respecto a la fase estacionaria.

El proceso de partición que se presenta en la cromatografía involucra dos tipos de procesos, uno estático o de equilibrio y otro dinámico o de flujo.

* Proceso estático o de equilibrio.

Este proceso se describe para definir el volumen de retención de la fase gaseosa en equilibrio con la fase estacionaria (líquido-sólido), volumen que se requiere para la separación del soluto mediante su solubilidad total en la fase estacionaria. Este volumen de retención V_R además de ser función de la polaridad de la fase estacionaria, también es función de la temperatura a la cual se realiza el proceso y la presión de entrada y de salida de la fase móvil. Existe también el llamado volumen de retención de soluto no retenido en la fase estacionaria V_0 , volumen que al substraherse del volumen de retención V_R nos representa el volumen real de retención en equilibrio en las dos fases; este volumen se define como volumen de retención corregido V'_R . Al relacionar el volumen con el flujo de la fase móvil en ml/min, se obtiene el tiempo de retención corregido. La distribución que presenta el soluto en las fases, es función del coeficiente de distribución K .

$$K = C_s/C_m$$

K = coeficiente de distribución.

C_s = concentración del soluto en la fase estacionaria.

C_m = concentración del soluto en la fase móvil.

El volumen neto de retención va aumentar o disminuir de manera directa respecto a la fase estacionaria.

Se puede decir que el volumen específico de retención depende únicamente de dos factores en un solvente dado: de la presión de vapor del soluto y de su coeficiente de actividad.

La separación de los componentes de una mezcla, se realiza cuando los valores del coeficiente de distribución K o su volumen de retención son diferentes entre sí.

* Proceso Dinámico.

Teniendo en cuenta los fenómenos de solubilidad y de vaporización de los componentes que se desean separar, se tiene que el ancho de los picos obtenidos representan el equilibrio que se establece entre las fases para la separación, así como la velocidad de difusión del soluto en estado de vapor en la fase móvil a lo largo de la columna y de las partículas sobre las cuales se hace la distribución.

Cuando los fenómenos expuestos se realizan en forma eficiente, el perfil de la dispersión de las moléculas es una curva Gaussiana (Katz, E., 1988). El centro del perfil representa la velocidad promedio de las moléculas del soluto; desviaciones del valor de la media son consecuencia de variaciones en la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria debido principalmente a cambios en el flujo a través de la columna por irregularidades en el acomodo del empaque y por variaciones en el porcentaje de fase sobre el soporte sólido. La medición de la eficiencia de la columna está dada por el número de platos teóricos, éste parámetro se calcula en función de los datos obtenidos del cromatograma.

N. Número de platos teóricos.

$$N = 16(t'_r/W_b)^2$$

donde

N= número de platos teóricos

W_b = ancho del pico en la base del trazo

t'_r = tiempo de retención corregido

Para el caso de la cromatografía cada plato teórico representa una distribución de equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. De aquí que a mayor número de platos teóricos se tendrá una mejor separación de los componentes.

HEPT. Altura equivalente a un plato teórico.

$$HETP = L/N$$

donde

HETP= altura equivalente a un plato teórico

L= largo de la columna

N= número de platos teóricos

Cuanto más pequeño es este valor, se tiene mayor número de platos teóricos por unidad de longitud y por lo tanto, mayor eficiencia.

A continuación se dan algunas otras definiciones cromatográficas:

- Resolución (R)

La eficiencia en la separación de dos componentes adyacentes, se determina por la separación pico a pico de los compuestos y su ancho de pico a la base:

$$R = t_R / 0.5(W_A + W_B)$$

donde

R = resolución

t_R = tiempo de retención

W_A = ancho del pico en la base del trazo del compuesto A

W_B = ancho del pico en la base del trazo del compuesto B

Valores mayores a 1.5 representan separaciones a línea base.

- Tiempo de retención (t_R).

Es el tiempo que una muestra requiere para eluir. Este se mide desde el momento de la inyección hasta el máximo del pico. Es un tiempo característico para cada compuesto, según el disolvente usado y el empaque de la columna a una temperatura dada.

- Compuesto no retenido (t_M).

Es el tiempo de elución requerido por un compuesto no absorbido como lo es el disolvente. Este parámetro se emplea para medir el volumen muerto o espacio total de la columna.

- Tiempo de retención corregido (t'_R).

Es el tiempo de retención t_R menos t_M . Este tiempo representa el tiempo real en el que el compuesto se queda retenido en la columna.

- Ancho de base (W_b).

Es la parte de la línea base que queda intersectada por las tangentes que se obtienen al trazar los puntos de inflexión del pico hacia la línea base.

- Coeficiente de partición (K).

$$K = \frac{\text{Concentración del soluto/ml de fase estacionaria}}{\text{Concentración del soluto/ml de fase móvil}}$$

El coeficiente de partición es una propiedad física fundamental. Es característica del soluto y el disolvente y es constante a una temperatura dada.

- Selectividad (α)

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

A mayor selectividad la resolución es mayor.

Cromatografía de Gases : la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. La fase estacionaria se encuentra distribuida en forma uniforme sobre un soporte inerte y en un porcentaje adecuado para la separación. La película que queda sobre el soporte tiene un espesor del orden de micrones (1×10^4 cm). La fase estacionaria se introduce en un tubo que puede ser de materiales como vidrio o acero inoxidable. A través de este tubo al que se le denomina columna empacada se percola el gas transportador (fase móvil) y los compuestos a separar en estado de vapor. Los compuestos se van a solubilizar y se eluyen de manera diferencial, esto va a depender de su polaridad y de su presión de vapor respectivamente (Nuño, M., 1978).

Existe otro sistema de distribución de la fase estacionaria sobre la superficie sólida, este sistema se denomina columnas capilares. Estas columnas se construyen de acero inoxidable o sílica fundida con diámetros interiores de 0.1mm a 0.53mm. En el interior de estas columnas la fase estacionaria queda distribuida como una película muy fina del orden de micrones (Nuño, M., 1978).

En cuanto a la instrumentación empleada en la cromatografía de gases se tienen los siguientes componentes:

* Gas transportador. Debe ser un gas puro (libre de humedad, componentes orgánicos), inerte (no debe interactuar con las fases y los compuestos a separar), adecuado al detector en uso. Para el caso del detector de captura de electrones se emplea nitrógeno muy seco, libre de oxígeno o bien argón con 5% de metano.

El flujo del gas debe ser tal que mantenga una separación adecuada y por lo tanto, la eficiencia de la columna en su máximo de operación.

* Inyector. Se tienen varios tipos de sistemas de inyección, algunos son sobre columna, sobre puertos de inyección calentados a temperatura de vaporización adecuada a la muestra de análisis, con válvula para gases, con sistema adecuado para columnas Megabore, con sistemas especiales para columnas capilares e inyectores programables.

* Horno (columna). El horno es el compartimiento donde se encuentra la columna en la que se van a realizar las separaciones. El horno debe tener la posibilidad de enfriar y calentar rápido y eficientemente según las condiciones del análisis, así como de tener un programador de temperatura.

* Detector. En este lugar cada uno de los componentes va a generar una señal eléctrica que en alguna forma y en función del fenómeno de detección se puede relacionar en forma exacta y precisa con la concentración del componente.

Características:

■ **Sensibilidad.** Se refiere a la concentración que puede medir, en función de la pendiente que presenta a los cambios de concentración. En una gráfica de concentración contra respuesta (mV) la pendiente esta representando a la sensibilidad.

■ **Nivel de ruido.** Es función del fenómeno de detección, la temperatura de operación, la pureza de los gases y la estabilidad del flujo en el sistema. Para medir el nivel de ruido electrónico de un detector y su estabilidad, se establece la mínima cantidad que puede detectar, la cual se define como aquella concentración que es capaz de dar el doble de la señal correspondiente al ruido electrónico.

■ **Linealidad.** Es una medida del intervalo de concentración, para la cual la pendiente mantiene constante.

■ **Respuesta.** Esto se refiere a que tipo de moléculas puede responder el detector. En función de su respuesta se pueden dividir en:

Detectores de respuesta universal (dan señal a todos los componentes de la muestra). Ejemplos: detector de conductividad térmica, IR.

Detectores de respuesta semiespecífica (dan señal a cierta clase de compuestos). Ejemplo: detector de captura de electrones, detector de fotoionización.

Detectores de respuesta específica (dan respuesta en función de átomos específicos que el compuesto contiene en su molécula). Ejemplo: detector de flama fotométrica, detector de nitrógeno-fósforo, detector de conductividad electrolítica

En el detector de captura de electrones se tiene una fuente radiactiva de níquel 63 o tritio que emite partículas β . Esta emisión de partículas β al pasar el gas acarreador por la cámara del detector, bombardea sus moléculas, originando una nube de electrones. Esta nube electrónica es atraída a un electrodo colector que se encuentra polarizado con respecto al ánodo. Este flujo de electrones origina una corriente que se maneja a través de un electromedidor y amplificador para producir una señal del orden de mV. cuando compuestos fuertemente electronegativos fluyen a

través del detector, estos capturan los electrones libres del gas transportador para completar su órbita, esta captura origina una disminución de la corriente que fluye a través del electrodo colector. Esta disminución de señal es proporcional a la concentración de los componentes eluyentes.

Este detector es de respuesta selectiva a compuestos fuertemente electronegativos, como lo son los derivados halogenados. Su sensibilidad es muy alta y su Linearidad es menor a la de otros detectores de respuesta semi-específica (Dickes, G.J., 1976).

CLAR se pueden mencionar los siguientes detectores:

Detector de índice de refracción. Es un detector de respuesta universal, se emplea para compuestos que no poseen compuestos cromóforos, actividad electroquímica o conductividad iónica. Principalmente se emplea para carbohidratos y lípidos. Tiene una aplicación especial en el análisis de polímeros por permeación en gel o cromatografía de exclusión (Miner, M. 1993).

Detector de fluorescencia. Este detector ofrece alta sensibilidad y selectividad. Se emplea para el análisis de pesticidas carbamatos, aflatoxinas, vitaminas y amino ácidos. Cuando se tienen compuestos que no presentan fluorescencia es posible realizar una derivatización para permitir que tales compuestos fluorescan (Miller, J., 1975).

Detector con arreglo de diodos UV. Los primeros detectores de CLAR fueron adaptaciones de instrumentos de UV que fueron diseñados originalmente para celdas estándares de gran volumen (2ml) dando una sensibilidad relativamente baja. La tecnología de los detectores se ha mejorado desde aquellos años, algunos detectores de longitud de onda sencilla ahora ofrecen de 2 a 3 ordenes de magnitud de sensibilidad con respecto a los anteriores. Los espectros de UV de alta sensibilidad se lograron con la introducción del detector de arreglo de diodos UV-visible; en este tipo de detector se tiene un arreglo de fotodiodos (más de 200) los cuales monitorean simultáneamente el espectro UV-visible, de esta manera se pueden obtener espectros altamente sensibles y sin distorsión de picos de elución. Los datos obtenidos de este detector de longitud de onda simultánea de UV se procesan y evalúan generalmente en un paquete computacional, en estos paquetes se pueden realizar búsquedas de archivos de espectros, especificación de longitud de onda para aumentar la sensibilidad, corrección de línea base, etc. (HP., 1994).

1.1.3. Validación.

Una parte muy importante en el desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, esto implica que se deberá probar que el método es efectivo. La validación de manera general incluye evaluar la precisión, Linearidad, exactitud y especificidad del método.

La validación es un proceso por medio del cual queda establecido, mediante análisis en el laboratorio, que el método tiene la capacidad de satisfacer los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

A continuación se muestran algunas definiciones relacionadas con la validación.

a) **Linearidad:** la Linearidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales se pueden obtener directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

a.1) **Intervalo:** esta definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

La **Linearidad del sistema** se determina construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método.

Criterio:

CV (coeficiente de variación) menor o igual a 1.5%
r mayor o igual a 0.99, r^2 mayor o igual a 0.98

La **Linearidad del método** se determina a partir de muestras adicionadas de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones que se manejen en las muestras adicionadas deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la Linearidad del sistema, incluyendo siempre el correspondiente al 100%.

Criterio:

Cantidad adicionada contra cantidad recuperada: $m = 1$, $b = 0$, r^2 mayor o igual a 0.98
Promedio de recobro: 98-102%
CV menor o igual a 2%

b) **Exactitud:** es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como porcentaje de recobro. Aquí se adiciona una cantidad conocida del compuesto de interés.

Se determina de cuando menos 6 muestras adicionadas de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Los análisis se deben hacer bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio:

El porcentaje de recobro y el CV deberán de estar de acuerdo a lo establecido en la Linearidad del método.

Porcentaje de recobro: 98-102%

CV menor o igual a 2%

c) **Precisión:** es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Generalmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y de repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

La **precisión del sistema** se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la Linearidad del sistema.

Criterio:

CV menor o igual a 1.5%

c.1) **Repetibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes bajo las mismas condiciones (analista, laboratorio, aparato, etc.).

c.2) **Reproducibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en el mismo y/o en diferente laboratorio, en diferentes días, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

La **precisión (reproducibilidad)** se determina de una muestra homogénea cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Criterio:

CV total debe ser menor o igual al 2%

d) **Límite de detección:** es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

e) **Límite de cuantificación:** es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

f) **Especificidad:** es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Si se cuenta con los posibles productos de degradación, preparar muestras adicionadas con la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Criterio:

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

g) **Estabilidad de la muestra:** es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo determinado por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución recién preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método de análisis. Las determinaciones se realizan por el mismo analista.

Criterio:

La muestra es estable si el IC (intervalo de confianza) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda el siguiente porcentaje:

$\pm 2\%$ (métodos cromatográficos).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los compuestos Clorofenólicos son considerados por la Organización Mundial de la Salud como contaminantes tóxicos prioritarios y ante la situación ambiental en la que nos encontramos, surge la necesidad de implementar un método analítico que pueda ser aplicado en aguas de desecho que provengan de la industria papelera, para ello el método deberá cumplir con ciertos requisitos tales como: Sensibilidad, Especificidad, Exactitud, Precisión, Linearidad, Bajo costo y Rapidez.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Optimizar la técnica de extracción y preparación de las muestras para determinar clorofenoles en aguas de desecho de la industria papelera.
- 3.2. Optimizar y validar la metodología analítica de cromatografía para determinar clorofenoles en aguas de desecho de la industria papelera.
- 3.3. Aplicar el método cromatográfico en el análisis de clorofenoles en efluentes industriales antes y después de recibir tratamiento microbiológico con la bacteria *Pseudomona* sp. RA2 y el hongo *Phanerochaete chrysosporium*.

4. HIPOTESIS

En los efluentes de la Industria Papelera se encuentran contenidos compuestos Clorofenólicos que se generan durante la etapa de blanqueo, dichos compuestos son tóxicos y dañinos para el medio ambiente y los seres vivos, al implementar una metodología analítica que cumpla con ciertos requisitos tales como: sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión y Linearidad se podrán analizar de manera satisfactoria muestras de efluentes reales provenientes de la industria antes mencionada.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1. Cromatografía

Los análisis cromatográficos se realizaron bajo las siguientes condiciones:

■ CROMATOGRAFO DE GASES TRACOR 570
DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES
INTEGRADOR PE 1020
GAS ACARREADOR: NITROGENO
FLUJO: 30ml/min
TEMPERATURA PROGRAMADA (entre 120 a 280°C).
VARIAS COLUMNAS.

- a) OV-17-1.5%/OV-210-1.95%
- b) OV-17/3%
- c) SE-30/15%
- d) SP-2100/6%
- e) Capilar Alltech 15mX0.53mm RSL-200
- f) Capilar OV-17

■ CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS VARIAN
DETECTOR UV CON ARREGLO DE DIODOS VARIAN POLYCHROM 9065
BOMBA VARIAN INERT 9012
INYECTOR AUTOMATICO VARIAN 9300
COMPUTADORA DIGITAL VENTURIS
COLUMNA VARIAN C₁₈ 5um 4.6X25cm BONDESIL
FASE MOVIL: ACETONITRILO-ACIDO ACETICO(1%)
AGUA-ACIDO ACETICO (1%)
Análisis por gradiente
Longitud de onda: 278nm.
Loop: 100ul

Para analizar los estándares y las muestras se emplearon las siguientes metodologías de derivatización:

- Cromatografía de gases.

Método de derivatización: cloroacetilación (Lee-H.B., 1985).

Referido para 100ml de muestra.

Medir pH y ajustar a neutro con ácido o base según sea conveniente. Adicionar 1g de carbonato de potasio anhídrido a la muestra y agitar hasta completar disolución. Adicionar 25ml de éter de petróleo, adicionar 1ml de anhídrido cloroacético y agitar por un minuto. Separar las fases. Vaciar la capa acuosa al matraz de reacción, adicionar 25ml de éter y 1ml de anhídrido cloroacético y agitar por un minuto, repetir el proceso de extracción. Realizar una tercera cloroacetilación bajo las mismas condiciones solo que hay que agitar por 8 minutos. Adicionar sulfato de sodio anhídrido y después adicionar 3ml de isooctano. Evaporar hasta sequedad y aforar a 3ml con isooctano e inyectar al cromatógrafo.

Método de derivatización empleando anhídrido acético.

Se disolvieron 1g de pentaclorofenol en ácido acético(29ml), adicionar 0.37g de anhídrido acético al matraz de reacción (0.4ml), agitar con calentamiento. Agregar unas gotas de agua fría, agitar y observar si precipita, si precipita hay que adicionar más agua y filtrar al vacío para separar; si no hay precipitación extraer con disolvente orgánico (hexano o éter de petróleo), lavar la fase orgánica con salmuera para eliminar los residuos de ácido acético. Adicionar sulfato de sodio para secar, decantar y lavar el sulfato de sodio con más disolvente, evaporar con rotavapor hasta que se elimine totalmente el disolvente.

Se realizó una evaluación de ambas derivatizaciones mediante espectroscopía de IR y RMN de los compuestos obtenidos.

Análisis de muestras que recibieron tratamiento biológico.

Las muestras generadas del tratamiento biológico con *Pseudomonas* sp. RA2 se analizaron en cromatografía de gases utilizando una columna empacada OV-17 1.5%/OV-210 1.95%, con flujo de nitrógeno a 30ml/min. Se empleó temperatura programada, el programa fue el siguiente: 139°C por 8 minutos hasta 250°C durante 5 minutos.

Las muestras obtenidas del tratamiento biológico con *Phanerochaete chrysosporium* se analizaron en una columna SP-2100/6%. el programa empleado fue: 120°C 8 minutos, incremento de 6°C por minuto hasta 260°C por 5 minutos, aumentar 20°C por minuto hasta 300°C y permanecer 5 minutos.

- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Método de extracción de clorofenoles con cloruro de metileno **(P. A. Realini, 1981).**

Realizar una extracción con 100ml de cloruro de metileno, separar las fases, posteriormente con porciones de 50ml realizar 3 extracciones, separar las fases.

A la fase acuosa se le adicionan 100ml de cloruro de tetrabutil amonio 0.01M, ajustar el pH a 14 con NaOH concentrado. Extraer 4 veces con porciones de 50ml de cloruro de metileno. Juntar los extractos orgánicos. Evaporar a sequedad. Aforar a 5ml e inyectar al cromatógrafo.

5.2. Validación (Metodología).

Linealidad del sistema.

Los compuestos clorofenólicos seleccionados fueron: fenol, o-clorofenol, m-clorofenol, p-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol. Se preparó una mezcla de estos compuestos y se analizó en CLAR, se determinaron sus tiempos de retención y se obtuvieron sus espectros de adsorción.

Se analizaron cinco concentraciones de cada uno por triplicado.

Estabilidad de la muestra.

Se analizaron tres muestras adicionadas bajo diferentes condiciones, las cuales fueron temperatura ambiente a 24 y 48 horas y temperatura de congelación libre de la luz a 24 y 48 horas. La inyección se hizo por duplicado.

Especificidad.

Se analizaron tres muestras adicionadas con compuestos de interferencia (estándares), en este caso los compuestos fueron 2,6-diclorofenol, 3,5-diclorofenol y 2,4,5-triclorofenol.

De cada muestra se realizó el análisis por duplicado.

Exactitud.

Se realizaron seis determinaciones de muestras adicionadas con estándares, el análisis se realizó por duplicado.

Linealidad del método.

Se trabajaron tres niveles de concentración por triplicado y doble inyección de muestras adicionadas.

Para la validación se realizó un análisis del efluente industrial que proporcionó una fábrica de papel, la finalidad fue conocer la cantidad de clorofenoles basales contenidos en el efluente.

Antes de la evaluación de cada parámetro se realizaba el análisis de la mezcla de estándares clorofenolicos para fines de identificación y cuantificación.

6. DISCUSION DE RESULTADOS

6.1. Variaciones del producto final obtenido por diferentes métodos de derivatización.

En las reacciones donde se realizó acetilación con ácido acético/anhídrido acético se obtuvieron 0.9157g de un compuesto blanco. Se realizó IR (Figura 22a del anexo) a una muestra y se observó que el compuesto de interés no se formó. Se partió de 1.01g de PCF. Este resultado indica que casi toda la materia prima se esta recuperando al final del proceso sin haber logrado que se formará el compuesto de interés.

Para el caso donde se utilizó anhídrido cloroacético, se tiene que se partió de un gramo de PCF y se obtuvieron 0.639g de un compuesto blanco cristalino. Se determinó el punto de fusión el cual fue de 126 a 129°C. La formación del cloroacetato derivado del pentaclorofenol se comprobó por espectroscopía de IR (Figura 22b del anexo) y por RMN de hidrógeno (Figura 24 del anexo) los espectros confirmaron que el compuesto esperado si se obtuvo al final de la reacción y además este se encuentra puro.

En el espectro de IR se observó la aparición de la señal en 1786 cm⁻¹ la cual indica la presencia de el grupo carbonilo en la molécula y la desaparición de la banda ancha en 3330 cm⁻¹ indica la pérdida del hidrógeno fenólico.

En el espectro de RMN se observó solo un singulete en 4.3 ppm. Este desplazamiento químico coincide tanto con la multiplicidad esperada en la molécula como con el valor teórico calculado (4.33) utilizando la regla de Shoolery (Silverstein, 1991).

6.2. Muestras de licores que recibieron tratamiento con microorganismos.

En las muestras que recibieron tratamiento con la bacteria *Pseudomonas* sp. RA2 se identificaron y cuantificaron compuestos clorofenólicos, estos fueron: PCF, 2,3,5,6-tetraclorofenol y 3,4-diclorofenol en concentraciones de 17.81, 2.01 y 0.98ppm respectivamente.

En las muestras de licor alcalino tratado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* se pudieron identificar 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol. Los porcentajes de degradación fueron de 32.68, 71.99, 54.99 y 90.86% (Bañuelos, P. 1994).

6.3. Empleo de diferentes columnas cromatográficas (cromatografía de gases).

De todas las columnas empleadas en la que se obtuvieron mejores resultados fue la columna capilar OV-17, el programa de temperatura empleado fue:

130°C por 8 minutos, aumentar 2°C por minuto hasta 160°C permanecer cero minutos, aumentar 5°C por minuto hasta 220°C permanecer 2 minutos.

En la Tabla I se muestran los tiempos de retención de los compuestos clorofenólicos en una mezcla de estándares y en la Figura 2 se muestra el cromatograma obtenido bajo estas condiciones de operación.

Tabla I. Identificación de clorofenoles en una mezcla de estándares (cromatografía de gases)

COMPUESTO	tr (min)
p-clorofenol	6.47 (a)
3,4-diclorofenol	13.68 (b)
2,4,5-triclorofenol	17.09 (c)
2,3,5,6-tetraclorofenol	23.69 (d)
Pentaclorofenol	30.27 (e)

tr: tiempo de retención

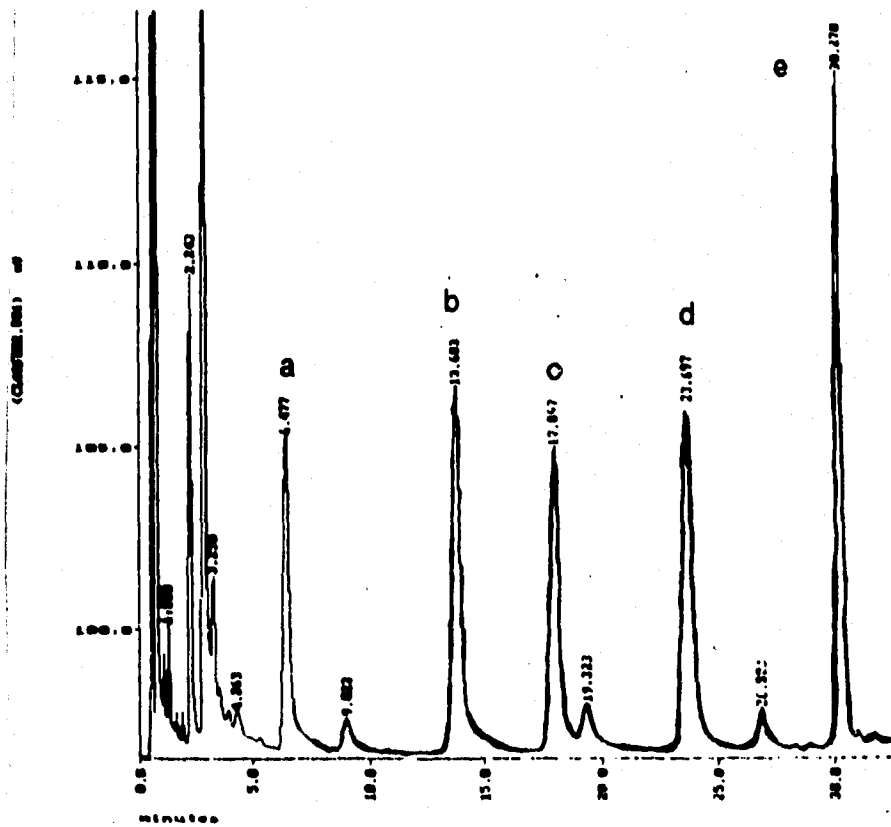


Figura 2. Cromatograma de estándares clorofenólicos obtenidos en una columna capilar OV-17. Se utilizó temperatura programada.

6.4. Resultados CLAR.

En la Tabla II. y figura 3 se muestran los resultados obtenidos en CLAR de acuerdo con las condiciones reportadas en la parte experimental de este trabajo.

Tabla II. Identificación de clorofenoles en una mezcla de estándares (CLAR)

COMPUESTO	tr
fenol	7.43
o-clorofenol	10.73
p-clorofenol	11.43
m-clorofenol	11.81
2,4-diclorofenol	14.55
2,4,6-triclorofenol	17.83
2,3,5,6-tetraclorofenol	20.27
Pentaclorofenol	22.71

Se observa que la resolución obtenida fue bastante buena aun en la separación de aquellos isómeros que son tan difíciles de separar, los monoclorofenoles. Los estándares están solubilizados empleando NaOH 1 N, agua y HCl 1N. Se observa también que la línea base es muy estable al preparar de esta forma las soluciones de estos compuestos, al emplear disolventes orgánicos se obtienen resultados no satisfactorios.

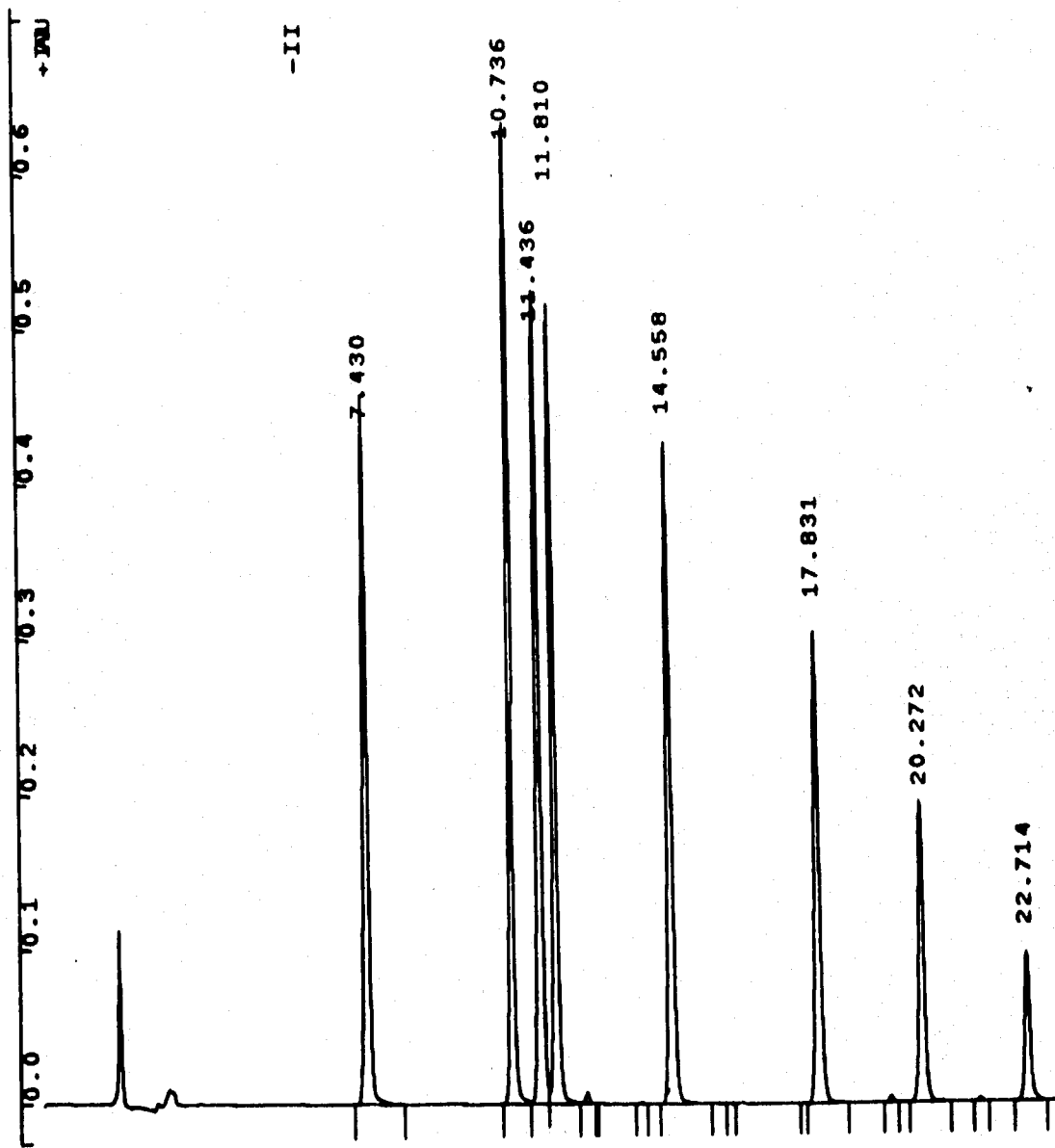


Figura 3. Cromatograma de compuestos clorofenólicos analizados por CLAR en una columna C₁₈.

Validación.

Linealidad del sistema.

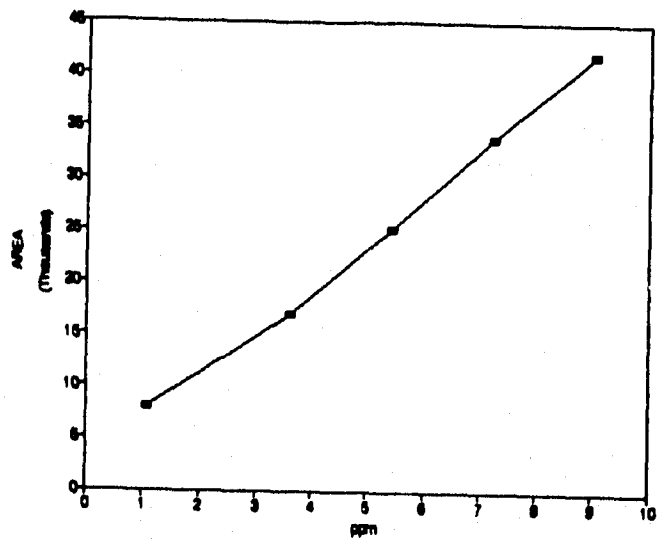
En las figuras 4, 5, 6 y 7 se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los compuestos clorofenólicos.

En la Tabla III se muestran resumidos algunos aspectos de la Linealidad del sistema.

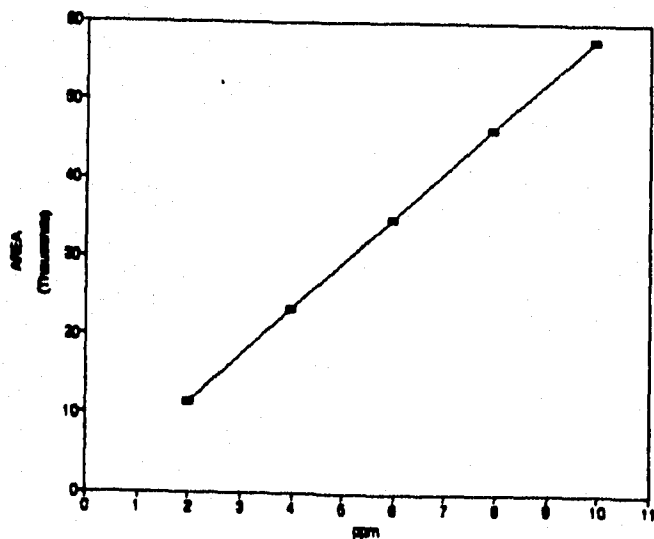
Tabla III. Linealidad del sistema (CLAR).

COMPUESTO	RANGO (ppm)	r	CV
fenol	1.08-9.04	0.998	21.0
o-clorofenol	1.98-9.92	0.999	1.0
p-clorofenol	2.08-10.4	0.999	1.4
m-clorofenol	1.94-9.74	0.999	1.0
2,4-diclorofenol	2.2-11	0.964	18.6
2,4,6-triclorofenol	2.2-11	0.998	3.2
2,3,5,6-tetraclorofenol	2.22-11.12	0.998	3.2
Pentaclorofenol	2.15-10.76	0.998	41.4

Se observa que los coeficientes de correlación obtenidos están muy cercanos a 1 lo que nos indica la correspondencia que existe entre la concentración y el área obtenido en los análisis de este tipo de compuestos. Para el caso del 2,4-diclorofenol el valor de r es más bajo respecto a los demás valores obtenidos, para este compuesto se observa en su gráfica correspondiente que su rango lineal sería entre 2.22 y 8.8 arriba de esta concentración hay desviaciones (figura 6). Para el pentaclorofenol se observa que el rango lineal sería entre 2.15 y 8.6 (figura 7).

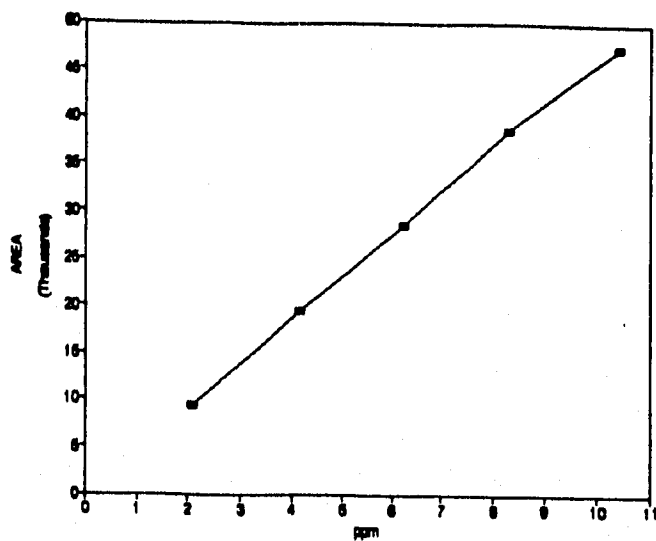


(a)

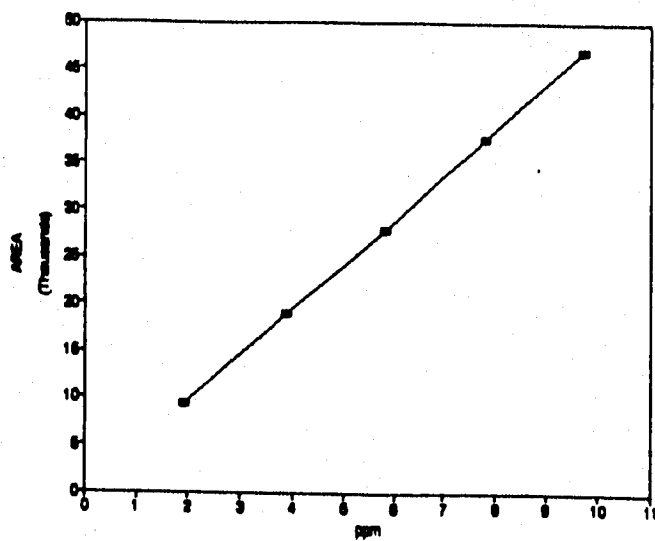


(b)

Figura 4. Curvas de calibración obtenidas para (a) fenol, $r = 0.998$, rango(ppm) = 1.08-9.04 y (b) o-clorofenol, $r = 0.999$, rango(ppm) = 1.98-9.92

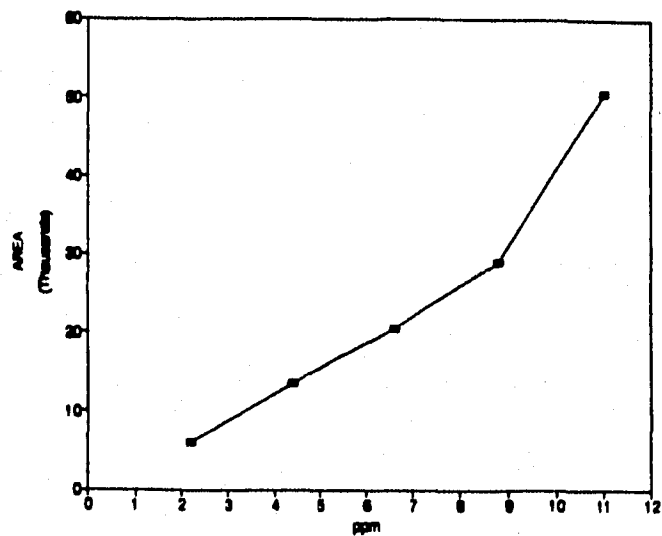


(a)

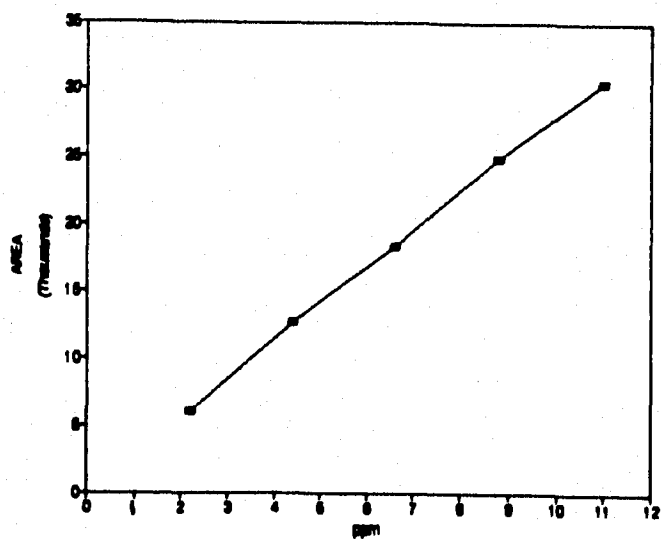


(b)

Figura 5. Curvas de calibración obtenidas para (a) p-clorofenol, $r = 0.999$, rango(ppm) = 2.08-10.4 y (b) m-clorofenol, $r = 0.999$, rango(ppm) = 1.94-9.74

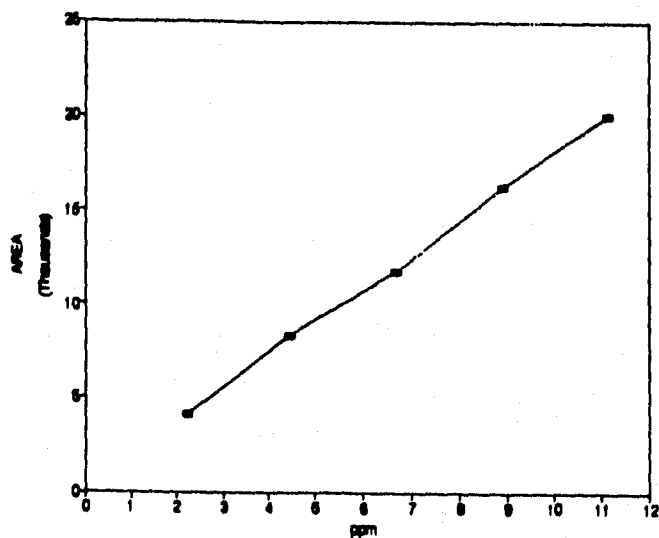


(a)

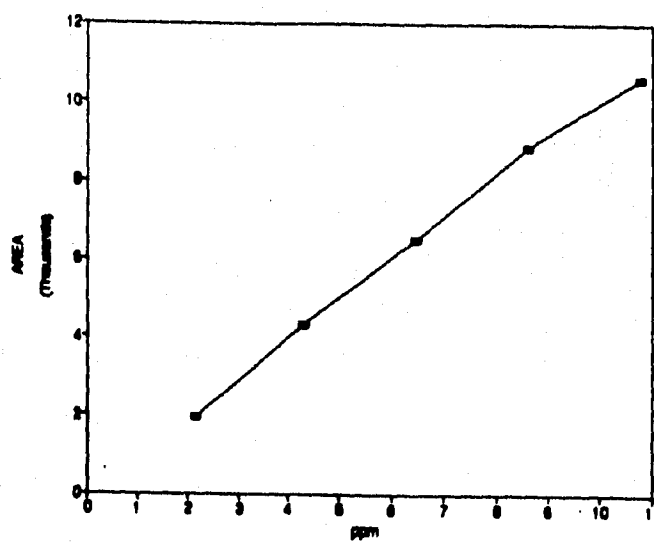


(b)

Figura 6. Curvas de calibración obtenidas para (a) 2,4-diclorofenol, $r = 0.964$, rango(ppm) = 2.2-11 y (b) 2,4,6-triclorofenol, $r = 0.998$, rango(ppm) = 2.2-11



(a)



(b)

Figura 7. Curvas de calibración obtenidas para (a) 2,3,5,6-tetraclorofenol, $r = 0.998$, rango(ppm) = 2.22-11.12 y (b) pentaclorofenol, $r = 0.998$, rango(ppm) = 2.15-10.76

Estabilidad de la muestra.

En la Tablas IV se muestran los resultados obtenidos para estabilidad de la muestra.

Tabla IV. Estabilidad de la muestra.

COMPUESTO	F.A/24hrs T.A - CONGELACION (%)	F.A/48hrs T.A - CONGELACION (%)
fenol	99.47 - 101.40	99.76 - 100.96
o-clorofenol	100.16 - 101.35	104.51 - 101.78
p-clorofenol	99.90 - 91.95	91.54 - 91.63
m-clorofenol	102.64 - 101.75	113.26 - 112.43
2,4-diclorofenol	101.85 - 98.78	101.59 - 100.85
2,4,6-triclorofenol	99.83 - 98.82	99.35 - 98.56
2,3,5,6-tetraclorofenol	100.50 - 99.74	100.37 - 100
Pentaclorofenol	100.50 - 99.74	100.37 - 100

T.A. = temperatura ambiente

En esta tabla se pueden observar los valores obtenidos para el denominado factor A que es un coeficiente de variación en donde se considera la relación que existe entre cada condición-tiempo y el análisis inicial de la muestra por cien. Este valor se considera aceptable en un rango entre 98 y 102% para que se considere que no hubo degradación.

m-clorofenol presenta estabilidad solamente a 24 horas y en congelación, libre de la luz; o-clorofenol es inestable a 48 horas en temperatura ambiente; p-clorofenol es inestable a las 48 horas tanto a temperatura ambiente como en congelación. Para los demás compuestos los resultados indican que son estables al menos durante 48hrs de haber sido extraídos de la matriz experimental ya sea en condiciones ambientales o en congelación y libres de la luz.

Especificidad.

Para la evaluación de este parámetro se adicionaron como compuestos de interferencia 2,6-diclorofenol; 3,5-diclorofenol y 2,4,5-triclorofenol los cuales pueden eluir en los mismos tiempos de retención que los compuestos de interés.

En la figura 8 se muestra el cromatograma de una muestra real adicionada con los compuestos de interferencia y en la figura 9 se muestra el cromatograma obtenido con los estándares.

Para la identificación de las señales se hizo uso de los espectros de absorción de cada compuesto. Se observa que si existe Especificidad ya que se pueden diferenciar claramente las señales de los compuestos analizados.

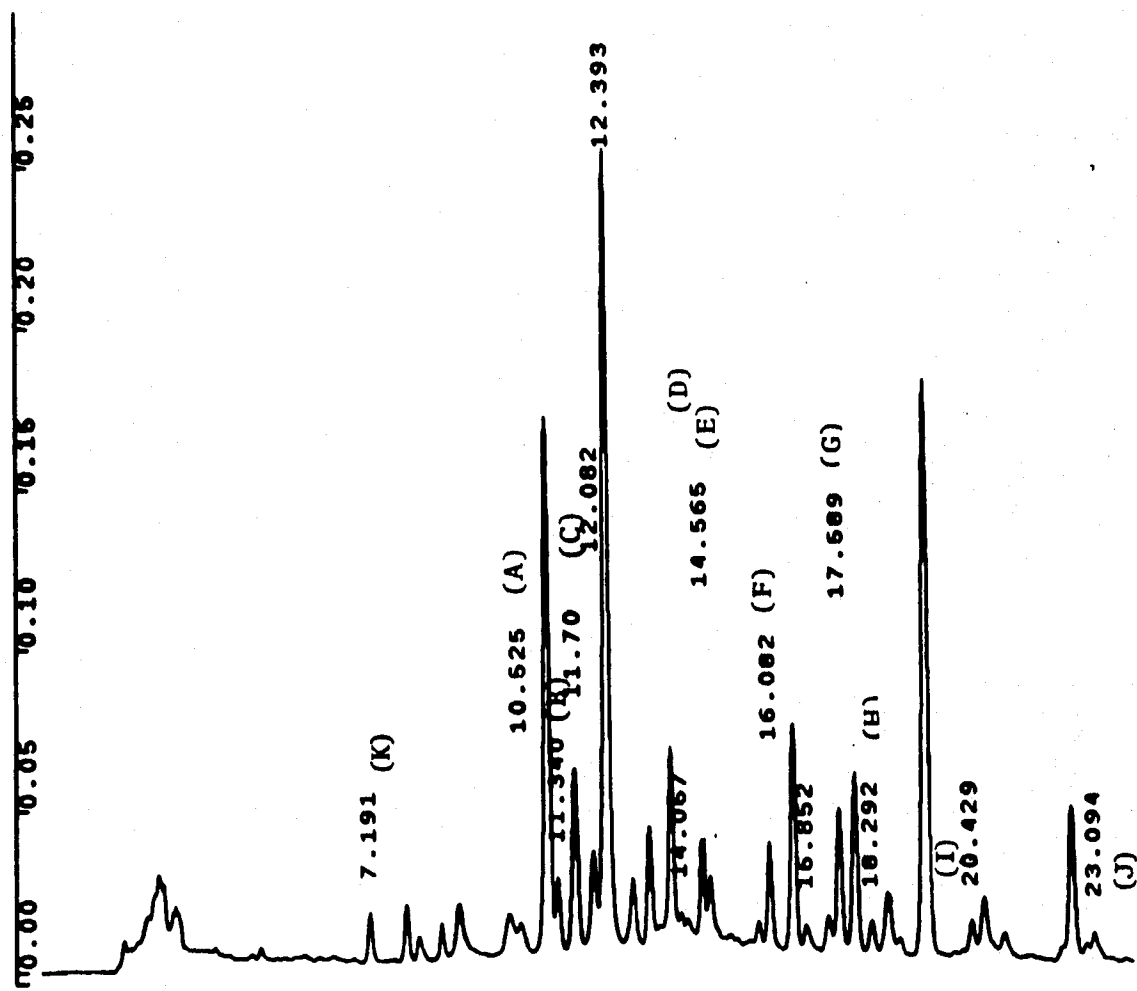


Figura 8. Muestra con compuestos de interferencia. (K) fenol; (A) o-clorofenol; (B) p-clorofenol; (C) m-clorofenol; (D) 2,6-diclorofenol; (E) 2,4-diclorofenol; (F) 3,5-diclorofenol; (G) 2,4,5-diclorofenol; (H) 2,4,6-triclorofenol; (I) 2,3,5,6-tetraclorofenol (J) Pentaclorofenol .

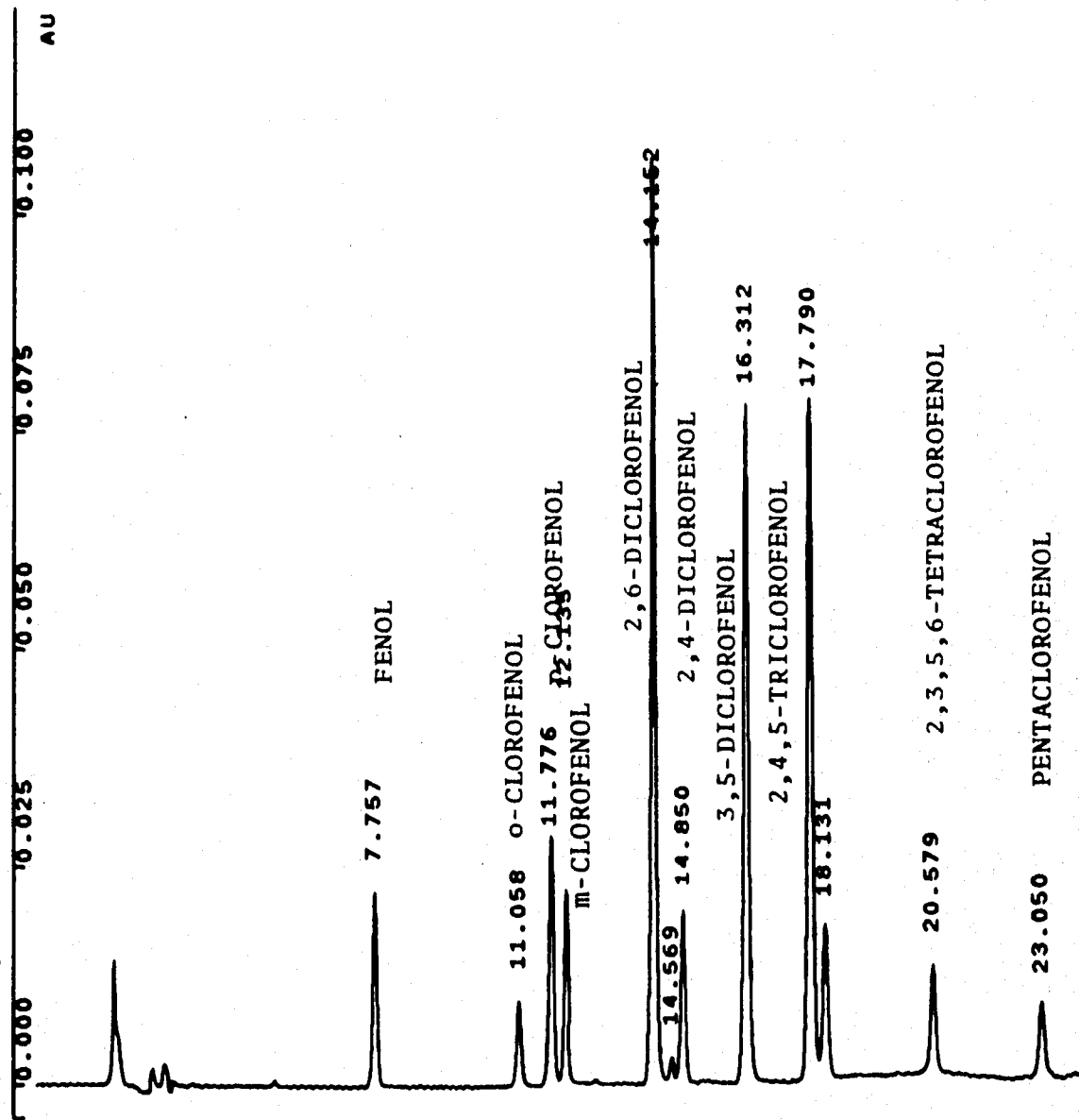


Figura 9. Cromatograma de compuestos clorofenólicos base mezclados con interferencias (estándares).

Identificación de clorofenoles en efluente real y determinación de exactitud.

En el efluente con el que se trabajo se lograron identificar m-clorofenol (0.64ppm) y 2,4,6-triclorofenol (0.062ppm). En la figura 10 se muestra el cromatograma correspondiente. En la figura 11 se muestran los espectros de absorción en un rango de 190 a 367 nm. de esta manera se confirmó la identidad de los compuestos contenidos en el efluente.

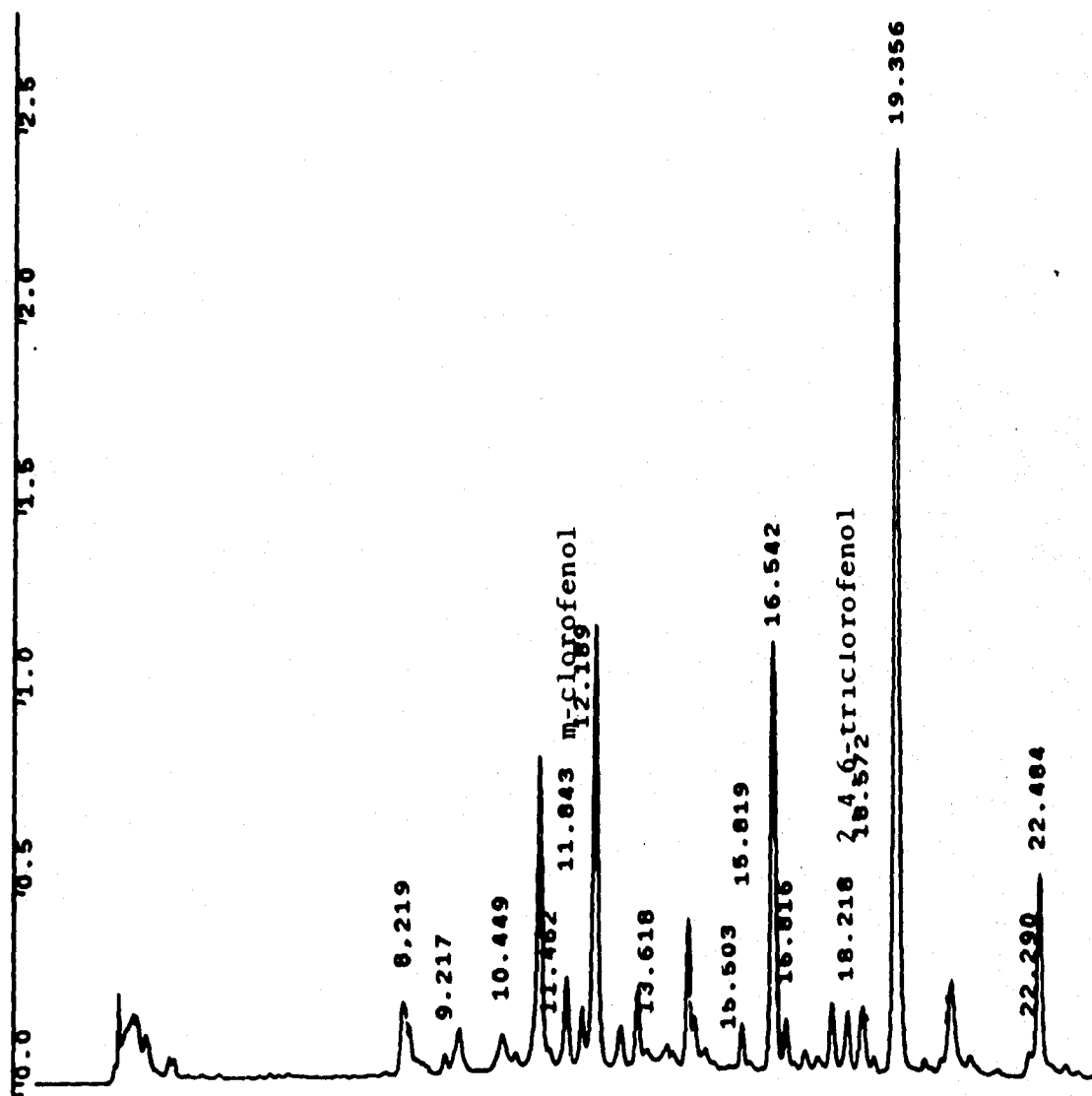


Figura 10. Cromatograma de identificación de compuestos clorofenólicos basales en el efluente.

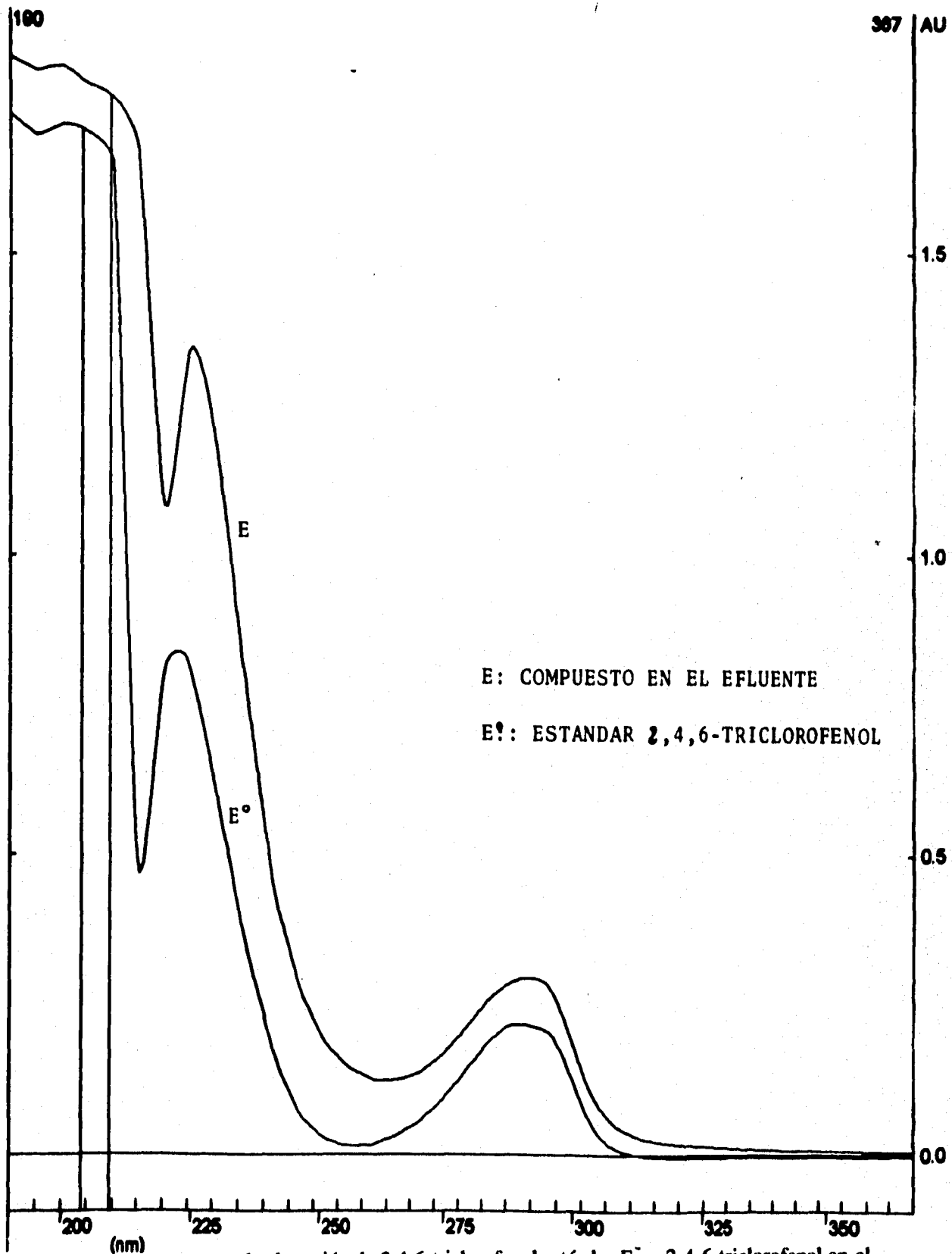


Figura 11. Espectros de absorción de 2,4,6-triclorofenol estándar E° y 2,4,6-triclorofenol en el efluente E.

Se puede observar que ambos espectros presentan igual patrón de absorción. De igual forma se pudo identificar al m-clorofenol.

En cuanto al porcentaje de recobro se obtuvieron los siguientes resultados:

2,4,6-triclorofenol 66.73%
2,3,5,6-tetraclorofenol 57.4%
Pentaclorofenol 56.1%

Para los demás compuestos el porcentaje de recobro fue bajo. De manera general se observó que a medida que el compuesto es más clorado las recuperaciones son más altas, esto se puede atribuir a la estabilidad de los compuestos. En base a los resultados obtenidos se puede decir que este tipo de residuales son matrices complejas para ser analizadas.

Linearidad del método.

En la Tabla V se muestran los valores de r para cada uno de los compuestos y el rango de concentraciones en los que se trabajó específicamente.

Tabla V. Linearidad del método.

COMPUESTO	RANGO (ppm)	r
fenol	1.36 - 5.4	0.98
o-clorofenol	1.47 - 5.95	0.82
p-clorofenol	1.53 - 6.24	0.98
m-clorofenol	1.43 - 5.84	0.98
2,4-diclorofenol	1.57 - 6.6	0.98
2,4,6-triclorofenol	1.57 - 6.6	0.98
2,3,5,6-tetraclorofenol	1.57 - 6.67	0.99
Pentaclorofenol	1.52 - 6.45	0.97

El método es lineal para todos los compuestos en el rango de concentraciones probadas excepto para o-clorofenol, en este caso r es de 0.82 por lo que se puede decir que no existe correlación entre la concentración y el área obtenida.

En este caso se observó un fenómeno similar al obtenido en otros parámetros, a mayor cloración es mayor la estabilidad del compuesto y su análisis no es tan problemático.

La cantidades mínimas cuantificadas en estas condiciones y además dentro de Linearidad se reportan en la tabla VI.

Tabla VI. Cantidad Mínima Cuantificada

COMPUESTO	ppm
fenol	0.36
o-clorofenol	0.39
p-clorofenol	0.41
m-clorofenol	0.38
2,4-diclorofenol	0.44
2,4,6-triclorofenol	0.44
2,3,5,6-tetraclorofenol	0.44
Pentaclorofenol	0.43

Como nota diferencial del PCF se observó que este absorbe más a 254nm a diferencia de todos los demás que presentan mayor señal a 278nm.

7. CONCLUSIONES

Los clorofenoles son compuestos que debido a sus propiedades tóxicas resultan ser muy interesantes de estudiar y una parte muy importante es su determinación analítica, esta se puede realizar por cromatografía de gases o bien de líquidos.

A continuación se muestran las conclusiones que se obtuvieron con la realización de este trabajo, se agrupan de manera general en tres partes.

a) CROMATOGRAFIA

- La aplicación de cada una de ellas va a depender del rango de concentraciones que se tengan, así, para la cromatografía de líquidos se puede hablar de concentraciones de ppm y para gases de ppb.

- Se concluye que la cromatografía de líquidos ofrece grandes ventajas comparativamente con la cromatografía de gases, dentro de tales ventajas se pueden mencionar la rapidez y facilidad en los análisis.

- Los equipos de cromatografía de líquidos con detector de Uv con arreglo de diodos como el que se utilizó ofrecen grandes ventajas ya que es posible realizar una confirmación de los resultados que se obtienen por medio de los espectros de absorción de los compuestos.

- CLAR puede ser empleada en la identificación de compuestos en efluentes reales. En el efluente con el que se trabajó se lograron identificar dos compuestos de tipo clorofenólico, estos fueron m-clorofenol en 0.64ppm y 2,4,6-triclorofenol en 0.062ppm.

- Utilizando CG con detector de captura de electrones y derivatizando la muestra con anhídrido cloroacético se pueden determinar los compuestos clorofenólicos en licores que han recibido tratamiento biológico con *Pseudomona* sp. RA2 y el hongo *Phanerochaete chrysosporium*.

B) CONCLUSIONES: VALIDACION

- Linearidad del sistema.

El sistema ofrece muy buena Linearidad bajo las condiciones en las que se trabajo para la determinación de fenol, o-clorofenol, p-clorofenol, m-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol; para 2,4-diclorofenol y Pentaclorofenol el sistema presenta Linearidad en un rango de 2.22-8.8 y 2.15-8.6 respectivamente (Tabla III).

- Estabilidad.

Las mayoría de las muestras una vez que se procesan (extraídas de la matriz) son estables hasta las 48 horas en condiciones ambientales o bien en congelación y libres de la luz.

m-clorofenol y p-clorofenol deberán ser analizados dentro de las primeras 24 horas, las muestras deberán ser congeladas y cubrirse de la luz.

En el caso de o-clorofenol la muestra es inestable a las 48 horas (temperatura ambiente) de haber sido procesada, esto indica que si se requiere hacer el análisis a este tiempo las muestras deberán congelarse.

- Especificidad.

El método es específico ya que tiene la habilidad de dar respuesta únicamente a la sustancia de interés y no a otros compuestos que pueden venir mezclados (Figura 8 y 9).

- Exactitud.

Los porcentajes de recobro obtenidos fueron:

2,4,6-triclorofenol 66.73%
2,3,5,6-tetraclorofenol 57.4%
Pentaclorofenol 56.1%

Para el 2,4-diclorofenol, monoclorofenoles y fenol los porcentajes de recobro fueron muy bajos. Se concluye que este tipo de residuales son matrices complejas y por ello los porcentajes de recobro obtenidos se consideran satisfactorios.

- Linearidad del método.

El método es lineal en el rango de concentraciones probadas de los fenol, p-clorofenol, m-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4,5,6-tetraclorofenol y Pentaclorofenol (Tabla V). Para el caso específico de o-clorofenol no hay Linearidad en el rango de 1.47 a 5.95ppm ya que el coeficiente de correlación es de 0.82

C) CONCLUSIONES: METODOLOGIA DE EXTRACCION Y PREPARACION DE MUESTRAS.

- La solubilización de estándares y de muestra se debe realizar en NaOH-agua-HCl para obtener cromatogramas adecuados (se forma una sal de los compuestos).
- La metodología de extracción es aplicable al análisis de muestras reales de efluentes que contienen compuestos clorofenólicos.
- De manera general se concluye que a menor cloración de los compuestos se presentaron más dificultades en los análisis, los compuestos son más inestables.

8. SUGERENCIAS

- De acuerdo con los objetivos planteados al inicio de este trabajo y con los resultados obtenidos queda por continuar la optimización de la técnica de extracción con cloruro de metileno y cloruro de tetrabutil amonio para mejorar los porcentajes de recuperación.
- Probar otros compuestos similares al cloruro de tetrabutil amonio en la técnica de extracción.

9. ANEXO

Se proporcionan los espectros de absorción de compuestos clorofenólicos en un rango de 190 a 367 nm.

Son una parte complementaria del análisis cromatográfico aplicado en la identificación de estos compuestos por ello es que se incluyen.

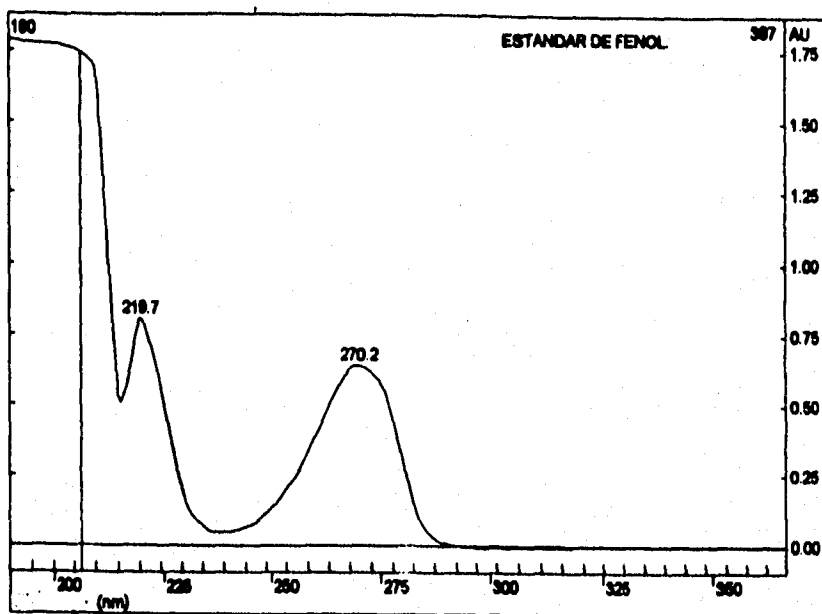


Figura 12. Espectro de absorción de fenol (190 a 367nm).

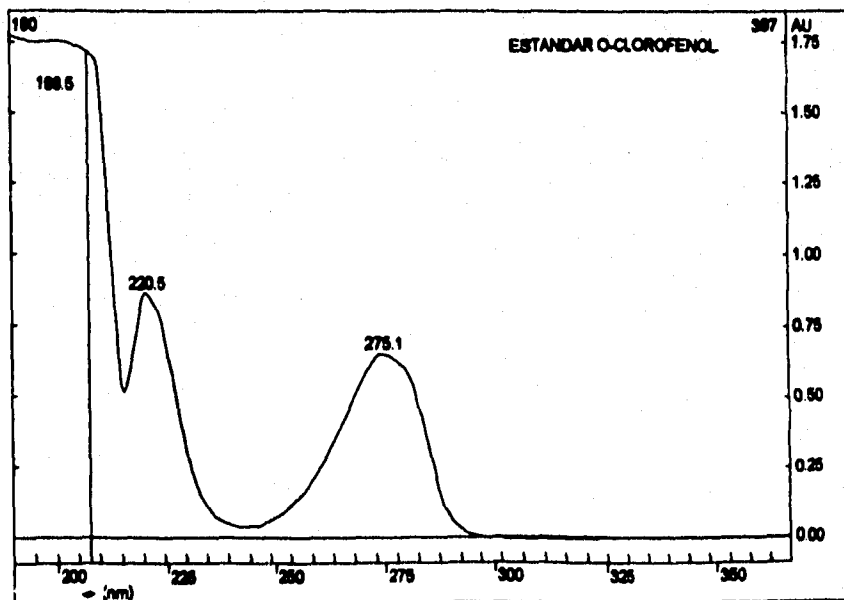


Figura 13. Espectro de absorción de o-clorofenol (190 a 367nm).

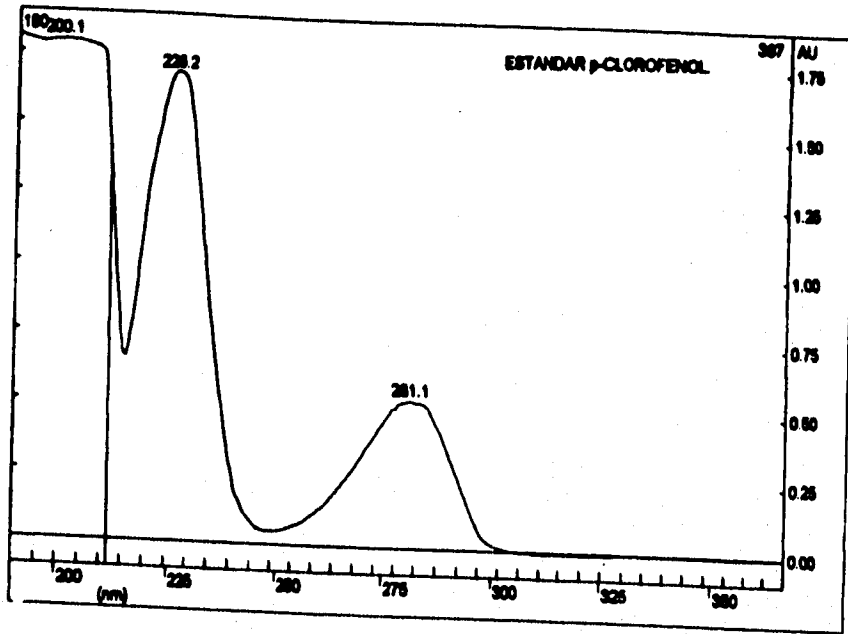


Figura 14. Espectro de absorción de p-clorofenol (190 a 367nm).

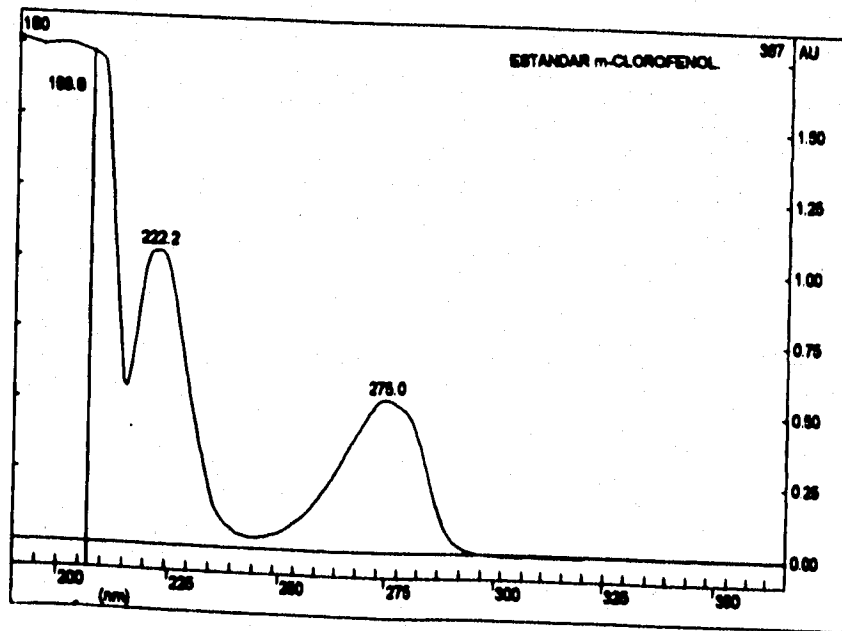


Figura 15. Espectro de absorción de m-clorofenol (190 a 367nm).

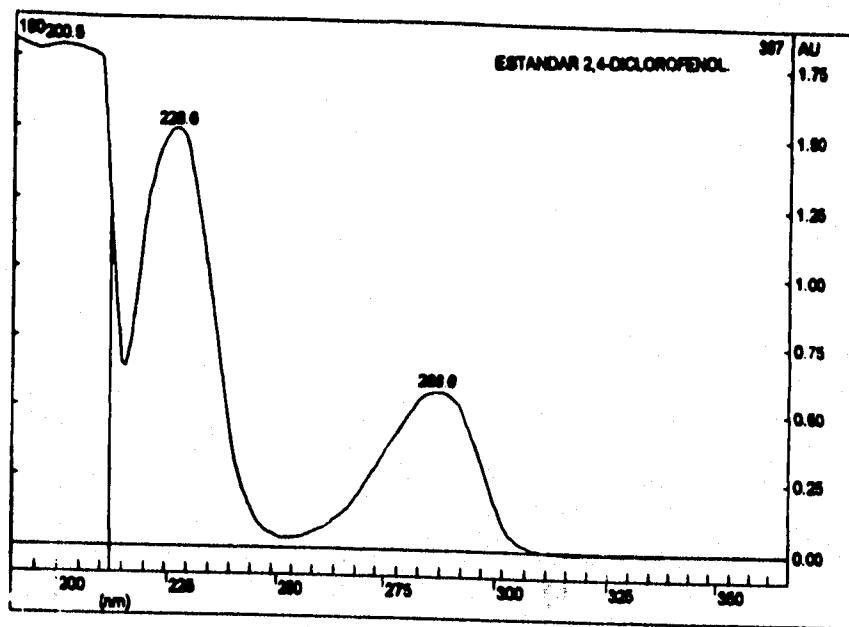


Figura 16. Espectro de absorción de 2,4-diclorofenol (190 a 367nm).

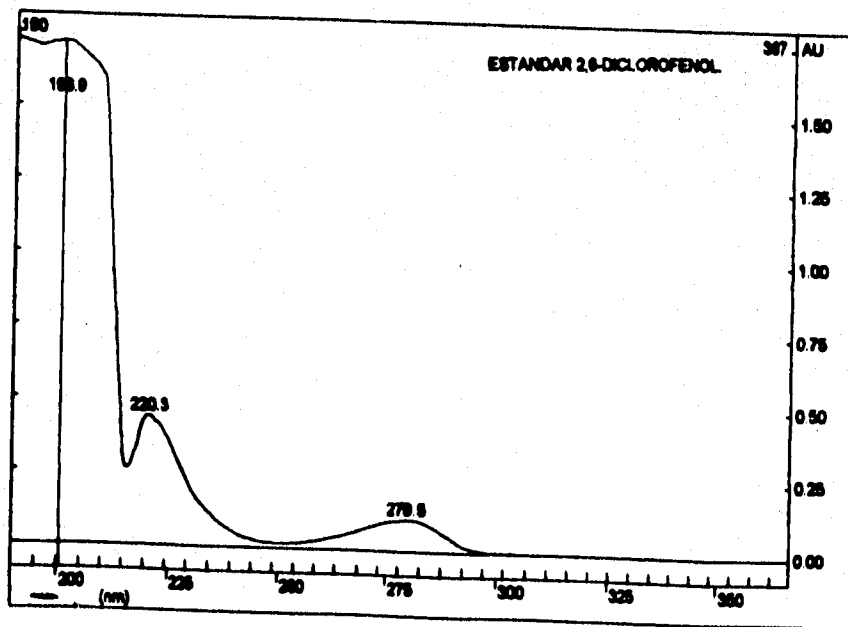


Figura 17. Espectro de absorción de 2,6-diclorofenol (190 a 367nm).

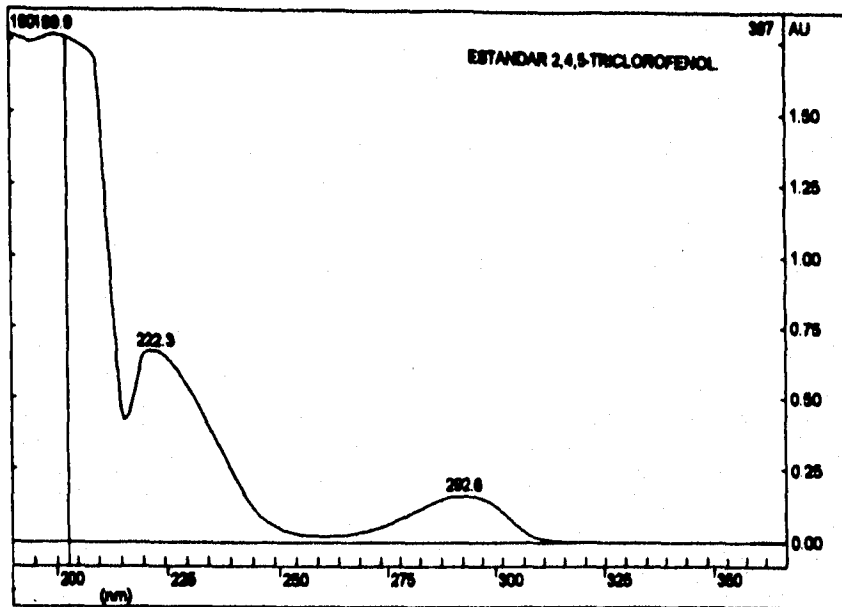


Figura 18. Espectro de absorción de 2,4,5-triclorofenol (190 a 367nm).

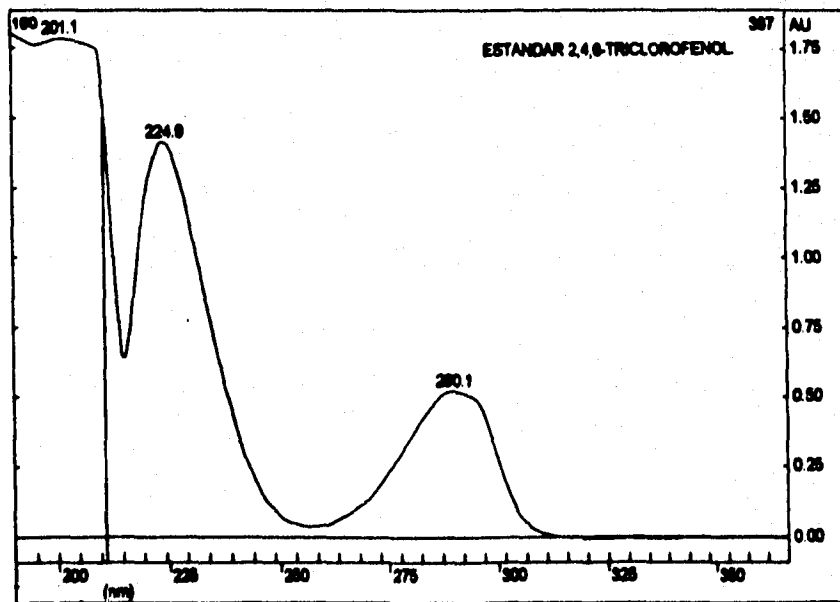


Figura 19. Espectro de absorción de 2,4,6-triclorofenol (190 a 367nm).

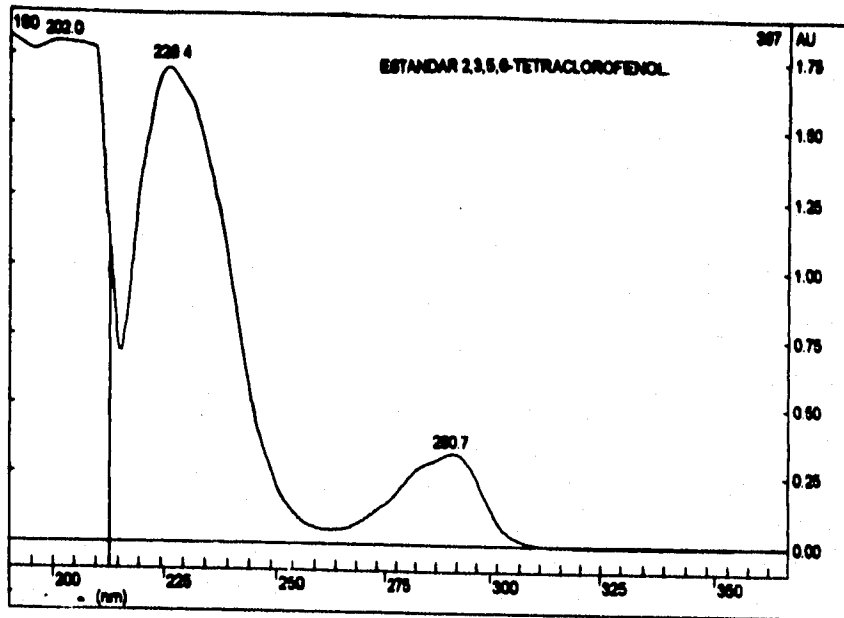


Figura 20. Espectro de absorción de 2,3,5,6-tetraclorofenol (190 a 367nm).

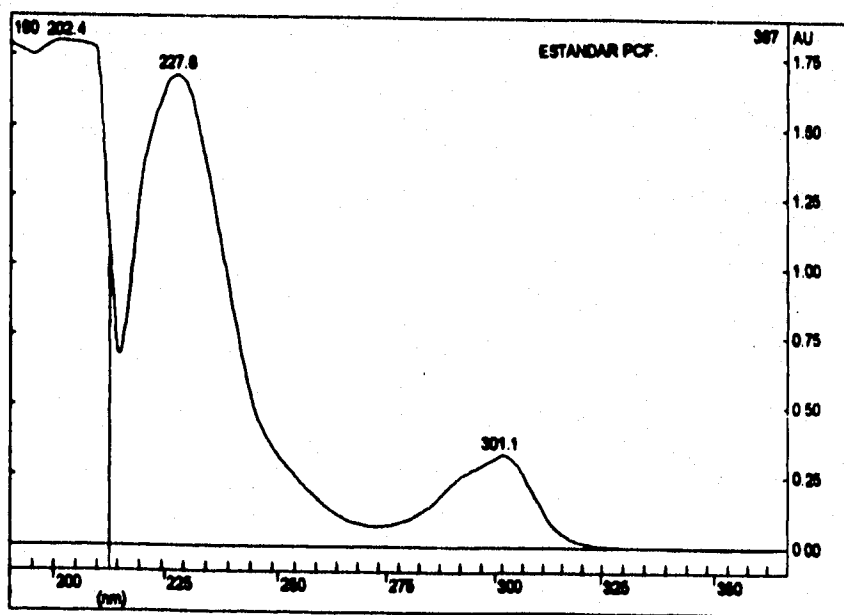


Figura 21. Espectro de absorción de pentaclorofenol (190 a 367nm).

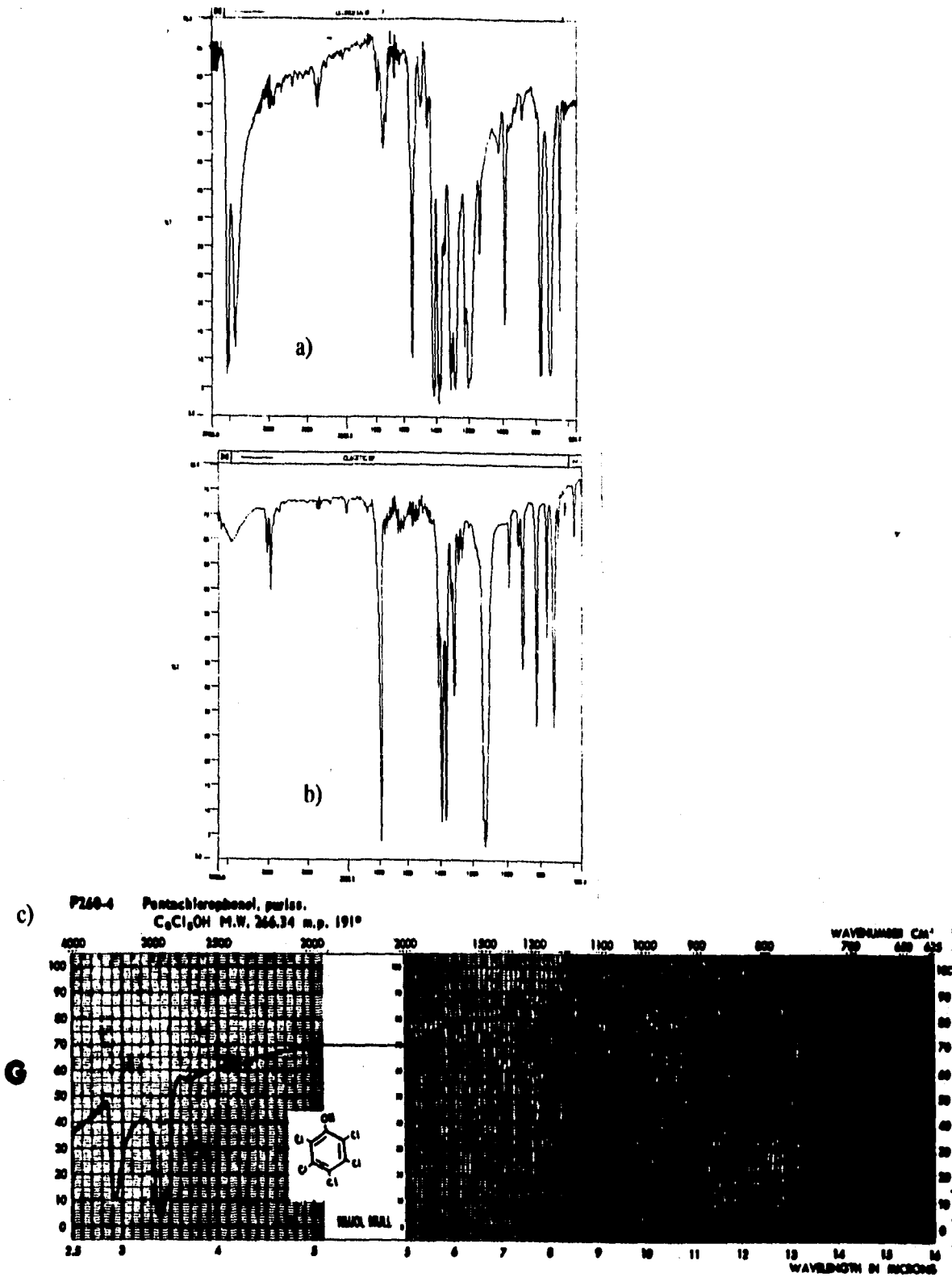


Figura 22. Espectros de IR. a) Producto de reacción donde se empleó ácido acético-anhídrido acético. b) Producto de reacción donde se empleó anhídrido cloroacético y c) Estándar de pentaclorofenol (materia prima).

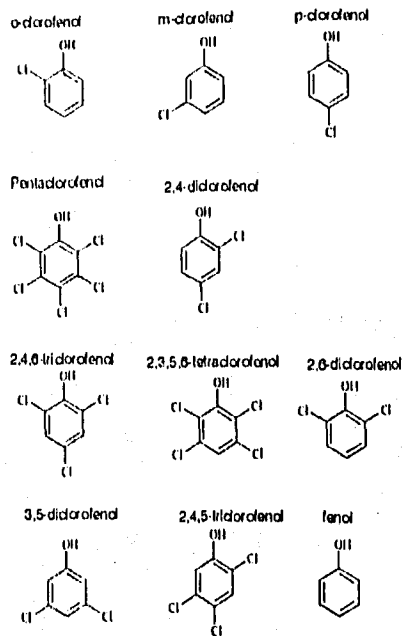


Figura 23. Estructuras químicas de compuestos clorofenólicos.

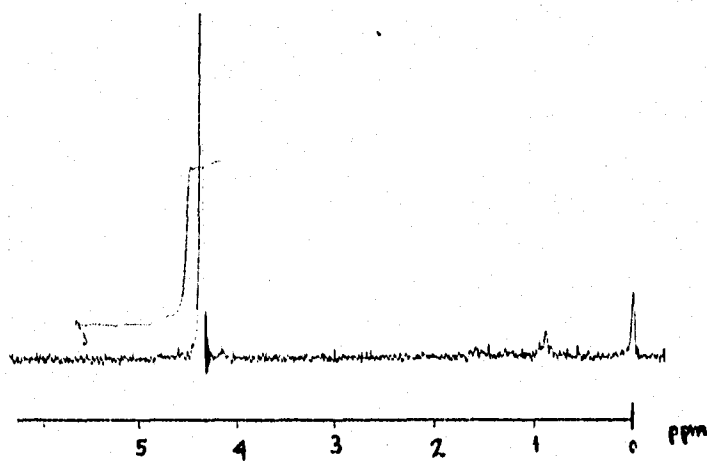


Figura 24. Espectro por RMN de hidrógeno correspondiente a la formación del cloroacetato de pentaclorofenol.

ABREVIATURAS

CLAR: cromatografía de líquidos de alta resolución

UV: ultra violeta

r: coeficiente de correlación

r²: coeficiente de determinación

m: pendiente

b: ordenada al origen

IC: intervalo de confianza

PCF: pentaclorofenol

2,4-DCF: 2,4-diclorofenol

nm: nanometros

CG: cromatografía de gases

MCF: monoclorofenoles

ppm: partes por millón

CV: coeficiente de variación

IR: infrarojo

RMN: resonancia magnética nuclear

11. BIBLIOGRAFIA

Bañuelos Pánuco Adriana. Tesis para el título de Q.F.B. Reducción de color de aguas residuales provenientes de una empresa papelera empleando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. UNAM. FES Zaragoza. México, D.F., 1994.

Bartle, K. et.al., (1977). Use of modified tenax GC column packing for the direct Gas Chromatographic analysis of phenols in water at the ppm level. *Journal of Chromatography*. 135: 351-358

Bergbauer, M. and Eggert C. (1992). Differences in the persistence of various bleaching effluent lignins against attack by white-rot fungi. *Biotechnology Letters*. 14(9):869-874.

Browning, B.L., (1975). *The chemistry of the wood*. Krieger-Publish Co. U.S.A.

Busto, A., (1987). Determination of priority phenols by isocratic HPLC. *Chromatographia*. 24: 613-616

Busto, O. et.al., (1991). Optimization of isocratic mobile phase composition for HPLC. Analysis of eleven substituted phenols. *Chromatographia*. 32: 566-572

C. Rappe and S. Marklund. (1978). *Chemosphere*. 7: 269

Coutts, R. et.al., (1979). Gas chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution. *Journal of Chromatography*. 179: 291-299

Dickes, G.J. and Nicholas, P.V. (1976). *Gas Chromatography in Food Analysis*. The Butterworth Group. London.

E. Tesarova. V.Pacakova. (1983). Gas and high-performance liquid chromatography of phenols. *Chromatographia*. 17: 269-284

Environnement Canada/Santé et Bien-être social Canada (1991), Liste de substances d'intérêt prioritaire Rapport d'évaluation no. 2. *Effluents des usines de pâte blanche*. Canada.

Fernández, M., (1991). Simultaneous determination of pentachlorophenol and carbaryl in water. *Chromatographia*. 32: 238-240

Gawdzik, et. al., (1988). A new polymer for off-line preconcentration of chlorophenols from water. *Chromatographia*. 25: 504-506

G. Kung-Jou Chao. (1981). *Journal of Chromatography Science*. 20: 436

Hoshika, Y., 1979. Sensitive gas chromatographic determination of phenols as bromophenols using electron capture detection. *Journal of Chromatography*. 179: 105-111

(HP)Hewlett Packard. (1994). Water Analysis Organic Micropollutants. Hewlett-Packard company. Alemania.

Katz, E. (1988). *Quantitative Analysis using Chromatographic Techniques*. John Wiley & Sons. USA.

Korhonen, I., (1983). Gas-capillary GC of chlorobenzenes on SE-30 and carbowax 20M columns. simultaneous determination of chlorobenzenes and chlorophenols. *Chromatographia*. 17: 195-199

Korhonen, I., (1985). Incremental effects of a formyl group introduced into the ortho- and para- positions of isomeric chlorophenols. *Journal of Chromatography*. 324: 192-198

Krijgsman, W., (1977). Determination of chlorophenols by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 131: 412-416

Krister and Nordin., (1976). Gas chromatography-MS of chlorophenols in spent bleach liquors. *Journal of Chromatography*. 128: 13-26

Lee, H-B., et. al., (1984). Chemical derivatization analysis of pesticide residues. IX. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 67: 1086-1091

Lee, H-B., et. al., (1985). Analysis of phenols by chemical derivatization. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 422-426

Libby, E.A. (1983). Ciencia y Tecnología sobre pulpa y papel. Tomo I: pulpa. Ed Continental., S.A. de C.V., México.

M.C. Rand, A.E. Greenberg, M.J.Taras.(1976). Standard method for examination of waste and wastewater, 14th ed. , *American Public Health Association.*, Washington, D.C.

Melcer, H. and Schnell, A. (1992). *Biological treatment for the control of toxic contaminants in bleached Kraft mill effluents*. Proceed. Intl. Symp. Implement. Biotechnol. Industr. Waste Treatment and Bioremed., Grand Rapids, MI, USA, Sept. 15-16.

Miller, J.M. (1975). *Separation Methods in Chemical Analysis*. John Wiley & Sons. USA.

Miner, M. (1993). *A practical guide to HPLC detection*. Chapter 2. Donald Parriot.

Nuño, M. (1978). *Cromatografía de gases*. Internacional científica, S.A. Primera edición. México, D.F.

Ono., A., (1983). Gas-liquid chromatographic resolution of free dichlorophenol isomers on new stationary liquid phases. *Chromatographia*. 17: 691-692

P. A. Realini. (1981). *Journal of Chromatography Science*. 19: 124

Poggi, V. H.M. (1994). Prevención de la contaminación del agua y tratamiento de aguas residuales en la industria de la celulosa y papel, Parte 1. *Prevención de la Contaminación*. 2: 12-18.

Presscott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, D.A. (1990). *Microbiology*, W.C. Brown Publ., IA, USA.

R.T.Coutts, E.E.Hargesheimer, F.M. Pasutto. (1977). *Journal of Chromatography*. 179: 291

Radehaus, P. and Schmidt S., (1992). Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2879-2885

Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. Dirección General de Normatividad y Regulación Ecológica., (1990). *Sustancias tóxicas consideradas por la OMS, EPA*.

Silverstein, R.M. et al. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Fifth ed. John Wiley & Sons, INC. Singapore.

Wegman, R.C. et.al., (1979). Chlorophenols in waters of the Netherlands. *Water Research*. 13: 651-657

W. Krijnsman, C. G. van de Kamp. (1977). *Journal of Chromatography*. 131: 142