



15
27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"

**SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
MOLÉCULAS ORGÁNICAS EN AGUA DE
PROCESO DEL CEMPASÚCHIL**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTAN:

ELÍAS GRANADOS HERNÁNDEZ

Y

XICOTÉNCATL LÓPEZ ANDRADE



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

JEFATURA DE LA CARRERA DE
INGENIERIA QUIMICA

OF/IQ/JU/082/008/96

**C. ELIAS GRANADOS HERNANDEZ y
XICOTENCATL LOPEZ ANDRADE
P R E S E N T E.**

En respuesta a su solicitud de asignación de jurado para el Examen Profesional, les comunico que la Jefatura a mi cargo ha propuesto la siguiente designación:

PRESIDENTE: ING. ALEJANDRO ROGEL RAMIREZ
VOCAL: DR. THANGARASO PANDIYAN
SECRETARIO: QUIM. MA. DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA
SUPLENTE: ING. JOSE BERMUDEZ MOSQUEDA
SUPLENTE: ING. LUIS MANUEL PEREZ PEREZ

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., 6 de mayo de 1996

ING. JOSÉ BENJAMÍN RANGEL GRANADOS
JEFE DE LA CARRERA

A Dios: Por brindarme la oportunidad de seguir viviendo

A mis padres: Por todo el apoyo que me brindaron durante toda mi carrera. Siendo ustedes un ejemplo para mi vida de honradez, generosidad, sencillez y trabajo. A ustedes les dedico este trabajo con todo mi cariño. Gracias

A mis hermanos: Por brindarme el apoyo y consejos que necesité para seguir adelante y en especial a Jaime y Carmen por su comprensión y paciencia

A Miriam: A ti Miriam te podría decir muchas cosas y yo creo que esta hoja no me alcanzaría para terminar, pero lo que sí te puedo decir es que has sido tú mi motivación y coraje para seguir adelante, mil gracias por estar con mígo y por tu cariño. "Te quiero mucho"

A mis amigos y profesores: Por que con sus consejos y enseñanzas he podido lograr algo muy importante para mí. Gracias

A mi sobrinos: Carlos, Carmen y Jeniffer porque los quiero mucho

ELLAS



*Agradezco sinceramente a todos aquellos
que de alguna manera u otra
contribuyeron con cualquier medio o
recurso para mi formación profesional*

XICO

INDICE

	Página
Agradecimientos	
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Situación actual de la contaminación ambiental	2
1.1.1 Contaminación del agua	3
1.2 La flor de muertos o cempasúchil	3
1.2.1 Antecedentes	3
1.2.2 Familia Asteraceae	4
1.2.3 Tribu Tageteae	5
1.2.4 Distribución geográfica	6
1.2.5 Género Tagetes	6
1.3 Aspectos generales del cempasúchil	8
1.4 Consecuencias de la industrialización del cempasúchil	9
1.5 El agua residual del cempasúchil	10
1.5.1 Generación	10
1.5.2 Tratamientos aerobios y anaerobios	11
1.6 Objetivos	13
1.7 Técnicas utilizadas para aislar los compuestos del cempasúchil	13
1.8 Alcances y límites	14
2. Técnicas cromatográficas	15
2.1 Antecedentes históricos	15
2.2 Métodos cromatográficos	18
2.2.1 Cromatografía de reparto	18
2.2.1.1 Cromatografía líquido-líquido	
2.2.1.2 Cromatografía gas-líquido	
2.2.2 Cromatografía de filtración sobre gel	21
2.2.3 Cromatografía de adsorción	21
2.2.3.1 Cromatografía líquido-sólido	
2.2.3.2 Cromatografía gas-sólido	
2.2.4 Cromatografía de intercambio iónico	26
2.3 Concepto de polaridad	26
2.4 Tipos de cromatografía utilizados en el proyecto	27
2.4.1 Cromatografía de columna	27
2.4.2 Cromatografía de capa fina	28
2.4.3 Cromatografía de alta resolución	29

	Página
3. Métodos espectroscópicos	32
3.1 Generalidades	32
3.2 Espectrometría infrarroja (IR)	33
3.3 Espectrometría de masas (EM)	34
3.4 Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)	36
4. Trabajo experimental	39
4.1 Material y equipo	39
4.2 Procedimiento (influyente)	39
4.3 Procedimiento (efluente)	47
4.4 Métodos químicos de identificación	51
5. Resultados y discusión	54
6. Conclusiones y recomendaciones	71
Bibliografía	72
Apéndice. Identificación de compuestos	

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Thangarasu Pandiyan (nuestro asesor) y a la Dra. Carmen Durán por su apoyo brindado durante la realización de este proyecto. Este proyecto de investigación fue apoyado financieramente por el Programa Universitario de Medio Ambiente de la Universidad Nacional Autónoma de México (PUMA) y por el Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado de la Coordinación General de Estudios de Posgrado (PADEP). También se agradece al Instituto de Química de la UNAM por suministrar las facilidades para la realización de los espectros en sus laboratorios.

RESUMEN

La industrialización de compasúchil es un proceso de varias etapas. Éstas abarcan desde su cosecha hasta la obtención de pigmentos para consumo animal y/o humano. Las consecuencias que ha traído su industrialización han sido, por un lado, un aporte económico para ciertas regiones del país, producto de la venta de la harina y, por otro, una contaminación indeseable por medio del agua residual generada en el proceso actualmente usado.

La obtención e identificación de compuestos de esta agua puede ayudar a mejorar el proceso de obtención, ya sea cambiándolo o modificándolo en alguna de sus partes y, por lo tanto, aprovechando mejor la industrialización de este recurso.

Para la extracción industrial de pigmentos de color natural de la flor de muertos o compasúchil (*Tagetes erecta*), la flor es primero almacenada en silos y la pasta resultante de la descomposición es prensada y secada en secadores de convección continuos o también en secadores intermitentes ("batch").

En el primer paso o "ensillado" (poniéndola en condiciones anaerobias para romper la pared celular y obtener el agua intracelular), el agua residual resultante contiene sólidos suspendidos (alrededor de 10 g/L) y sólidos disueltos (alrededor de 50 g medidos como demanda química de oxígeno, COD/L y 30 g medidos como demanda bioquímica de oxígeno BOD/L), en condiciones ácidas (pH=4 a 5). En el paso de prensado, el agua residual contiene alrededor de 25 g/L de sólidos suspendidos y el mismo contenido de materia disuelta y un valor de pH también ácido. Estudios previos de degradación biológica muestran una baja degradabilidad (aproximadamente de un 60%, medida como DQO).

Por esta razón, el objetivo de este estudio es aislar las moléculas orgánicas del influente así como del efluente de un bio-reactor anaerobio, por medio de técnicas cromatográficas y caracterizarlas por métodos espectroscópicos (IR, NMR, MS) para verificar las causas de esta baja biodegradabilidad.

Estudios del influente muestran que existen compuestos alifáticos de largas cadenas (2.5 g/L) así como compuestos aromáticos (como isoocitilalato, 100.0 mg/L; flavonona, 8.0 mg/L; 4-cloroetil-1,3-bencenodiol, 60.0 mg/L; 4-clorofenol, 68.0 mg/L; 4,4'-diclorobifenil, 50.0 mg/L; 2,4-diclorofenol, 40.0 mg/L) que están presentes en las aguas residuales, tanto del influente como del efluente. Estudios de espectroscopía del efluente anaerobio muestran que los compuestos aromáticos están aún presentes, ya que no fueron degradados por las biocomunidades anaerobias. Contrariamente, los compuestos alifáticos están presentes en muy bajas concentraciones en el efluente, indicando su alta biodegradabilidad.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

En las últimas décadas, enormes cantidades de compuestos químicos y elementos de origen agroindustrial e industrial han sido liberados al ambiente. Un gran número de ellos, particularmente aquellos estructuralmente relacionados con compuestos naturales, son fácilmente degradados por microorganismos de suelo y agua. Sin embargo, una proporción significativa, principalmente aquellos que tienen elementos estructurales nuevos o sustituyentes raramente encontrados en la naturaleza (xenobióticos), son sólo catabolizados lentamente y tienden a persistir y a acumularse en el ambiente (Omen, 1987).

Ciertos compuestos, particularmente aquellos que exhiben algún grado de toxicidad, contribuyen substancialmente a la contaminación ambiental. Recientes catástrofes ambientales han subrayado el agudo peligro que los compuestos químicos industriales constituyen para nuestra biosfera. Sin embargo, la existencia de muchos residuos descargados en sitios, y que contienen muchas sustancias tóxicas y una gran escala de contaminación crónica, ciertamente representa el más importante peligro a largo plazo.

Claramente, además de determinar las corrientes de producción de los compuestos químicos industriales más persistentes y tóxicos, es necesario aprovechar más eficientemente las capacidades biodegradativas de los microorganismos del suelo, el agua y el aire, para disminuir las consecuencias de la existencia y cantidad de contaminantes ambientales.

Con referencia a los residuos, las estrategias básicas son (1) minimizar la cantidad de residuo generado, (2) reducir la toxicidad de los residuos que se han generado y (3) encontrar la manera más satisfactoria de disponer y degradar los residuos que se han acumulado. No es un secreto que la práctica de "enterrar o quemar" está siendo agotada. Mientras hay algunos desarrollos existentes acerca de la incineración, es difícil encontrar sitios aceptables para esos incineradores. Es cierto que las demostraciones de técnicas para degradar y "destoxificar" corrientes de residuos y descontaminar compartimentos ambientales podrían llevar un largo camino hacia la dedicación de "frustraciones públicas" (Omen, 1987).

1.1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

Un recurso vital para todo ser vivo, como lo es el agua, se puede contaminar si se introducen en él, organismos, sustancias o energía. Esta contaminación es el resultado de las actividades del hombre e impide sus legítimos usos como recurso natural o como medio ambiente natural. La contaminación puede deberse a factores físicos, químicos o bióticos.

Los principales factores físicos (sólidos suspendidos, turbiedad y color) impiden la penetración de la luz en el agua, alterando los procesos fotosintéticos, trayendo como consecuencia alteraciones en la cadena alimenticia. Otros factores físicos que afectan el agua son los agentes tensoactivos (retrasan la autopurificación), la temperatura (disminuye la solubilidad del oxígeno en el agua) y la radioactividad (Durán de Bazúa *et al.*, 1991).

La contaminación química se refiere a los cambios químicos que afectan las comunidades acuáticas y al recurso agua. Así por ejemplo, la salinidad puede afectar la presión osmótica a que están adaptados los organismos. El pH afecta a los organismos ya que muchas sustancias son más tóxicas al aumentar el nivel de éste. También puede hablarse de efectos derivados de la actividad de la especie química como aquellos producidos por un biocida (herbicida, insecticida, plaguicida, etc) (Durán de Bazúa *et al.*, 1991).

La contaminación por efectos bióticos se da cuando se depositan en los cuerpos de agua receptores descargas municipales y efluentes de las industrias que procesan material biológico. Esto trae como consecuencia el incremento en el nivel de nutrientes de tal manera que el balance de las poblaciones de microorganismos es alterado (Durán de Bazúa *et al.*, 1991).

1.2 LA FLOR DE MUERTOS O CEMPASÚCHIL

1.2.1 ANTECEDENTES

Las Asteraceae, Synanthereae o Synantheraceae, nombre correcto de las compuestas, según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, constituyen la familia más numerosa de las Angiospermas, con cerca de 15000 especies agrupadas desde 12 hasta 20 tribus; representan el 10% de las fanerógamas conocidas a la fecha. De estas tribus, la *Tageteae* es un pequeño grupo que incluye entre 15 y 18 géneros y más de 200 especies, todas americanas (Rojo, 1989).

Entre los géneros de esta tribu, destacan por su mayor diversidad y número de especies *Dyssodia* y *Tagetes*, siendo las partes Sur y Centro de México las que más representantes tienen (Rojo, 1989). No obstante lo anterior, ambos géneros han sido poco estudiados en México. Con excepción de algunos trabajos, en México se ha presentado poca atención a los aspectos citogenéticos, palinológicos y químicos de ambos géneros, no obstante que algunas especies de *Tagetes*, eran utilizadas por los indígenas mexicanos desde antes de la conquista española (Rojo, 1989).

1.2.2 FAMILIA ASTERACEAE

Las *Asteraceae* es una de las familias más abundantes y homogéneas que han llamado la atención de numerosos botánicos, debido a sus características, su amplia distribución geográfica y ecológica y a su complejidad como grupo. Para la flora mexicana, esta familia representa uno de los grupos taxonómicos más importantes ya que constituyen más del 10% de los géneros de las fanerógamas conocidas en el país.

De acuerdo con Rojo (1989), la presencia de compuestos químicos, tales como lactonas, flavonoides, glucósidos cianogénicos, ácidos grasos, entre otros, podrían ser útiles en el conocimiento más exacto de las relaciones entre las tribus de la familia y de ésta con otras dicotiledóneas. Existen varios compuestos químicos registrados en las *Asteraceae* (Tabla 1).

De las aproximadamente 20,000 especies de *Asteraceae*, sólo 7,900 se han estudiado genéticamente; éstas son, en su mayoría, especies americanas y europeas, representando el 28% de las especies reconocidas.

Siendo las *Asteraceae* la familia más numerosa de las fanerógamas, pocas especies tienen importancia económica, ésta radica en la variedad de usos actuales y potenciales para la mayoría de las especies. Con actividad medicinal, tan sólo se conocen 30 especies, a la luz de la revisión química citada por Rojo (1989); pueden, sin embargo, reconocerse otros compuestos y propiedades antes desconocidos. Algunas especies tienen propiedades antiflogísticas, espasmódicas, fungistáticas, antihelmínticas, así como anticancerígenas, cicatrizantes, diuréticas y sedantes.

Como propiedades importantes para la industria alimenticia, algunas especies presentan sustancias dulces, amargas, con propiedades saborizantes o de especias y como aperitivos (ciertas especies argentinas). Algunas se utilizan como ceremoniales, y otras presentan actividad insecticida o considerada tóxica para algunos animales por la presencia de alcaloides que, aunado a la ausencia de

compuestos nitrogenados y aminoácidos no proteicos, podrían explicar el por qué estas plantas rara vez se utilizan en la dieta humana o como forraje (Rojo, 1989).

TABLA 1. Patrón químico de las Asteraceae (Rojo, 1989)

Clase de compuesto	Localización y actividad biológica
PRESENTES EN TODAS LAS TRIBUS	
1. Fructanos tipo inulina	en órganos de almacenamiento
2. Ácidos grasos	en semillas oleosas
3. Lactonas sesquiterpenoides	principalmente en hojas; sabor amargo
4. Alcoholes triterpenos pentacíclicos	como ésteres en el pericarpio de frutos, y generalmente en lípidos
5. Ésteres de ácido caféico	en hojas; la cinarina es diurético
6. Flavonoides metilados	en hojas y flores (como pigmentos amarillos)
PRESENTES EN LA MAYORÍA DE LAS TRIBUS	
7. Compuestos acetilénicos	en raíces y hojas; antimicrobianos en hojas y frutos
8. Aceites esenciales, incluyendo monoterpenos fenólicos	en hojas y frutos
9. Ciclitoles	en hojas
10. Cumarinas	en hojas y flores
PRESENTES EN UNAS CUANTAS TRIBUS	
11. Hule (poli-isopreno)	en raíces y tallos
12. Alcaloides de pirrolizidina	en hojas; altamente tóxicos
13. Ácidos triterpenoides	libres en flores; combinados con azúcar (como saponina) en hojas
14. Diterpenos	en todos los tejidos
15. Glucósidos cianogénicos	en hojas y frutos; tóxicos
16. Pigmentos antoclorícos	en flores amarillas
17. Crómenos	en hojas y raíces; insecticida
8. Amidas de ácidos grasos	en raíces; insecticida

1.2.3 TRIBU TAGETEAE

Las *Tageteae* han tenido distintas clasificaciones, desde su establecimiento por Cassini en 1829 hasta Rydberg en 1915, en que las divide en 2 subtribus. Son hierbas anuales o perennes, algunos arbustos; las hojas son generalmente opuestas y tienen glándulas oleíferas translúcidas abundantes en aceites esenciales.

Los estudios químicos de la tribu se han utilizado sobre todo como apoyo para establecer relaciones intratribales. Los contenidos de compuestos *acetilénicos*,

terpenoides, flavonoides y ácidos grasos son marcadamente diferentes de otras tribus (Rojo, 1989).

Cerca de la mitad de los géneros de la tribu son químicamente desconocidos, no obstante los pocos análisis químicos efectuados son útiles para determinar géneros y especies. Se ha reportado la existencia de *terpenoides, flavonoides, carotenoides, triterpenos, esteroides, tiofenos y ácidos grasos*.

La presencia de compuestos acetilénicos relaciona en gran medida a esta tribu con otras; en cambio, la ausencia de alcaloides y de lactonas sesquiterpenoides, la separa de otras tribus que sí las producen en gran cantidad. Es por esta diversidad de compuestos químicos que puede explicarse la importancia económica de la tribu.

1.2.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los integrantes de la tribu *Tageteae* crecen generalmente en suelos calcáreos, en hábitats desde moderada hasta extremadamente secos y entre las latitudes 35° N y 35° S, desde el centro de los Estados Unidos hasta el Centro de Argentina (Rojo, 1989). En México, se encuentran en gran parte del territorio, exceptuando el Noroeste de la península de Baja California y el Oeste de la península de Yucatán.

1.2.5 GÉNERO *Tagetes*

Tournefort en 1694 y Vaill en 1720 son los primeros en reconocer a *Tagetes*, pero fue Linneo en 1753 quien elaboró la primera publicación válida del género. El conocimiento químico sobre *Tagetes* se inicia en 1887 con Latour y Magnier de la Source (Rojo, 1989), al aislar cristales de quercetagetina de los pétalos de *T. erecta*.

Los estudios químicos actuales del género se han enfocado principalmente al análisis de los pigmentos y aceites esenciales de especies cultivadas; la presencia de estos aceites probablemente se relaciona con la atracción de polinizadores, repulsión de depredadores y quizás tenga una función antiséptica (Rojo, 1989).

Los análisis químicos se incrementaron en los últimos 30 años para todos los tipos de compuestos presentes y no sólo para las especies económicamente importantes, lo que permitió disertar sobre posiciones taxonómicas desde el nivel tribu hasta especie.

Aproximadamente el 30% de las especies de *Tagetes* han sido estudiadas por sus constituyentes secundarios entre lo que se encuentran flavonoides

(quercetagina) y terpenoides (monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos y carotenos) en flores y hojas; poliacetilenos (tiofenos) en raíz; y ácidos grasos. Los compuestos químicos que se conocen actualmente se exponen en la Tabla 2.

La importancia económica de las especies es muy amplia dada la variedad de compuestos presentes. Pueden usarse como emético, laxante, vermífugo, antisifilítico, antimalario y estimulante. También pueden usarse en productos alimenticios como condimentos, saborizantes y colorantes. Finalmente, pueden usarse como insecticidas y para objetivos ceremoniales (como en las "ofrendas" del Día de los Muertos).

Tabla 2. Compuestos químicos en Tagetes (Rojo, 1989)

Compuestos	En la mayoría de los compuestos	T. erecta	T. filifolia	T. lucida	T. minuta	T. patula	T. tanulfolia
Monoterpenos acíclicos		linalool tagetona	citral, limonina tagetona		citral, linalool, tagetona, occlmenos, mircenos		tagetona, occlmenos
Monocíclicos		limoneno	limoneno		limoneno, terpinol		
Bicíclicos							
Sesquiterpenos				eudesmol	eudesmol, aromadendrenol	aromadendrenol	eudesmol, aromadendrenol
Carotenos		luteína, xantina				luteína, xantina	
Aromáticos			esdragol	esdragol, augenol	esdragol, augenol		
Triterpenos							
Esteroides							
Flavonoides		quercetagina, tagetina			quercetagina, patuletina		
Poliacetilenos							
Ácidos grasos		láurico, mirístico, palmítico, oleico					

1.3 ASPECTOS GENERALES DE LA FLOR DE MUERTOS O CEMPASÚCHIL

Es una planta herbácea, anual, que alcanza de 50 a 60 cm de altura, sus hojas son opuestas, divididas y olorosas, las flores son de color amarillo o algo anaranjado, grandes (5 ó 6 cm. de diámetro), dobles las que han sido objeto de continuo cultivo, florece alrededor del mes de octubre.

Nombre botánico: *Tagetes erecta*

Familia: de las compuestas

Nombres vulgares: flor de muerto, cempasúchil (alteración del nombre azteca cempoalxochitl) que literalmente significa flor de veinte pétalos.

Estas flores eran muy populares entre los aztecas y todavía son favoritas en ciertas ceremonias que se dedican en el mes de noviembre a los difuntos; tienen uso en la medicina popular, tomando el conocimiento contra los cólicos acompañados de meteorismo. La Farmacopea Mexicana señala que tiene propiedades emenagogas y antihelmínticas.

El profesor Felipe Rodríguez hizo su tesis en 1884 sobre "la flor de cempoalxóchilt" y encontró colorante amarillo, resina, aceite esencial tanino, azúcar y materias extractivas mucilaginosas (Guerrero, 1980).

Existen poco más de 50 especies, todas americanas. En la zona cercana a la cuenca de México se han encontrado las siguientes:

Tagetes filifolia: Valle de Bravo, Santo Tomás de los Plátanos

Tagetes patula: Polotitlán y sus cercanías

Tagetes tenuifolia: Oro de Hidalgo, Ixtapan de la Sal

Tagetes stenophylla: Amatepec

Tagetes lucida: Villa del Carbón

Por costumbre alimentaria, el mercado de México y de otros países, en cuanto a pollo de engorda, requiere de una pigmentación amarilla considerable que puede ser proporcionada por diferentes materias primas naturales agregadas al alimento

balanceado, como son maíz amarillo, alfalfa y cempásuchil, o bien, pigmentos sintéticos.

Siendo México el principal productor de harina de cempasúchil que actualmente está teniendo auge como pigmentante en la alimentación de aves de corral (en la industria avícola), cabe hacer mención de la importancia de esta flor (Guerrero, 1980).

1.4 CONSECUENCIAS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE LA FLOR

Desde hace poco más de 30 años, el cempasúchil ha adquirido importancia debido a su industrialización para la producción de alimentos balanceados para aves. Antes de que se industrializara de esta manera, su principal demanda era como planta de ornato en las festividades (día de muertos). Desde aquél entonces y aún antes, esta actividad ha dado trabajo a una buena parte de la población en donde se cultiva, tanto a trabajadores del campo como a los que en la actualidad laboran en las compañías productoras de harinas y pigmentos.

Esta flor se cultiva principalmente en 8 estados de la República Mexicana y su producción total en 1993, contando riego y temporal, fue de 13,388 toneladas. Los estados que la producen en la actualidad son, en orden decreciente de producción, Oaxaca, Michoacán, Chiapas, Morelos, Distrito Federal, Jalisco, Guanajuato y Guerrero. Los principales estados que la producían en mayor escala eran Guanajuato, Puebla, Michoacán y, en menor escala, Zacatecas, Querétaro, Tlaxcala, San Luis Potosí y Baja California Sur, que, sumada su producción, dió un total de 82,650 toneladas (SARH, 1989).

El dato de producción más reciente (SARH, 1993) indica una baja sensible de ésta, debido a los problemas que enfrenta el campo y las compañías dedicadas a la industrialización del cempasúchil. Las ventas al extranjero han bajado y como consecuencia ha afectado principalmente al personal que labora en este tipo de empresas, generando un alto índice de desempleo (Cueto, 1994).

La industrialización, si bien llevó a las poblaciones empleo e ingresos, también produjo algo indeseable: la contaminación del agua y del suelo del lugar. El agua de desecho de las plantas procesadoras del cempasúchil es muy contaminante y genera, tanto malos olores como la inutilidad del suelo en donde se deposita.

1.5 EL AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL

1.5.1 GENERACIÓN

El agua residual que se trata en el laboratorio de PIQAYQA se obtiene de las plantas de la empresa Bioquimex ubicadas en Irimbo, Michoacán y Amayuca, Morelos. El agua residual, al ser demasiado contaminante, representa un problema de impacto ambiental por lo que se planteó darle un tratamiento biológico. En el caso de la planta de Irimbo, ésta procesa 200 toneladas de flor fresca al día, la cual produce 28 toneladas de sólidos y 172 toneladas de agua residual (Anónimo, 1990).

Para obtener la harina de cempasúchil se presentan dos operaciones, además del secado convencional, ensilado y prensado. En la primera operación es en donde se supone que se llevan a cabo casi todos los procesos de contaminación; el segundo proceso aparentemente contribuye sólo con una cantidad dada de sólidos suspendidos y disueltos. En la siguiente tabla se muestran las características representativas promedio de los efluentes de ensilado y prensado.

TABLA 3. Características del agua residual (Anónimo, 1990)

PARÁMETROS	CALIDAD DEL EFLUENTE (mg/L)	
	PRENSAS	ENSILADO
Sólidos suspendidos totales	24,000	3,150
Sólidos suspendidos volátiles	19,700	2,900
Sólidos disueltos totales	23,400	36,300
Fosfatos	1,500	1,580
N-Amoniaco	300	270
N-Orgánico	830	320
Demanda química de oxígeno total	72,600	92,000
Demanda química de oxígeno soluble	48,300	51,700
Demanda bioquímica de oxígeno total	40,170	56,900
Demanda bioquímica de oxígeno soluble	28,900	29,900
Grasas y aceites	470	480
Coliformes totales (NMP/100 ml)	0	0
Sólidos sedimentables (mL/L)	600	0
pH (unidades)	4.1	4.1
Caudal (L/s)	0.5	0.9

Si bien por sus características, dicha agua residual sugiere un sistema de tratamiento de tipo biológico, la presencia de ácido húmicos y fúvicos (productos de la descomposición vegetal) interfieren de cierta manera en los procesos de tratamiento de efluentes de coagulación y biológicos, razón por la cual los desechos que contienen se pueden clasificar como medianamente biodegradables.

Aunque se tiene una evaluación de la recuperación de partículas finas (recuperación de más del 90%), de todos modos se tiene por el efluente una descarga de pigmento de aproximadamente 1.173 kg/día (Anónimo, 1990).

1.5.2 TRATAMIENTOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS

El tratamiento biológico de las aguas residuales se basa en el proceso aparentemente simple en el que una población mixta de microorganismos utiliza como nutrimentos sustancias disueltas que contaminan el agua. Este es el mecanismo por el cual las corrientes de aguas naturales, como los lagos y los ríos, se autopurifican (Winkler, 1986). Los procesos biológicos han sido usados por cerca de 100 años para el tratamiento de aguas residuales industriales y municipales (Omen, 1987).

Los sistemas aerobios son los más corrientes y, en general, el proceso aerobio consiste en colocar una gran superficie de contacto entre el agua residual con comunidades bacterianas para que descompongan la materia orgánica disuelta biodegradable contenida en ella. La depuración aerobia requiere una vasta población de microorganismos de metabolismo activo capaces de degradar productos orgánicos tanto solubles como coloidales con una elevada tasa de conversión a CO_2 y agua (Brown *et al.*, 1989).

Existe un buen número de procesos aerobios, los que a su vez se dividen en variantes. En general pueden agruparse en procesos con biomasa en suspensión de tipo extensivo (lagunas), de tipo intensivo (lodos activados) y procesos de biopelícula (reactores empacados y biodiscos) (Jiménez y Martínez, 1995).

Por otra parte, en la digestión, la materia orgánica se descompone por la acción de los microorganismos en ausencia del oxígeno y se producen metano y anhídrido carbónico, principalmente. Se utiliza generalmente para la estabilización de lodos residuales del tratamiento de aguas negras. El proceso es también adecuado para el tratamiento de aguas residuales con altos contenidos de materia orgánica disuelta y coloidal biodegradable, comparables a los de los lodos espesados, como los provenientes de la producción de levaduras y de la fabricación de almidón de

maíz, además de las suspensiones de origen animal de las operaciones agrícolas intensivas (Winkler, 1986).

La digestión se puede explicar de manera sencilla dividiéndola en tres etapas. Primero, los compuestos de alto peso molecular, como las proteínas y los polisacáridos, son descompuestos en sustancias solubles de bajo peso molecular, como los aminoácidos y los azúcares. Esto se conoce a veces como la fase de "licuefacción". En segundo lugar, los nutrimentos orgánicos son convertidos en ácidos grasos en una fase de "fermentación ácida", que baja el pH del sistema. Finalmente, en la etapa de "fermentación del metano" o "metanogénica" los ácidos orgánicos son convertidos en metano, anhídrido carbónico y una pequeña cantidad de hidrógeno (Winkler, 1986).

Los procesos anaerobios son usados extensa y recientemente para convertir los lodos concentrados a una forma útil de combustible (resultantes de convertir el residuo tratado en gas metano). Estos procesos se han usado desde hace siglos en las fosas sépticas (los romanos ya las usaban).

Los sistemas de tratamiento biológico para aguas residuales que contienen compuestos recalcitrantes y/o tóxicos se basan en el uso de organismos adaptados para convertir estos compuestos químicos peligrosos a productos terminales inocuos (Omen, 1987).

Como se puede observar en la Tabla 3, este tipo de agua residual tiene una gran cantidad de material biológico disuelto y su demanda química de oxígeno se encuentra en un intervalo de 70,000 a 90,000 mg/L, además de tener un olor penetrante y desagradable. Por lo tanto es indispensable un tratamiento para disminuir la cantidad de materia orgánica disuelta y aminorar así, el impacto que se tiene sobre aguas y suelos.

Dentro de algunas alternativas disponibles para el tratamiento, lo óptimo en este caso se pensó que era un tratamiento biológico. Las aguas residuales que contienen solutos contaminantes se ponen en contacto con una densa población de microorganismos apropiados, durante un tiempo suficiente que permita a los microbios descomponer y convertir, según se desee, los solutos contaminantes. En los procesos naturales, los solutos se eliminan principalmente por descomposición, por lo general oxidación, por metabolismo microbiano y conversión en materias microbianas celulares (Winkler, 1986).

El tipo de tratamiento biológico utilizado en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo fue la digestión que, en la actualidad, es la alternativa para el tratamiento de aguas residuales de varios tipos. En particular, se utilizó un reactor de lechos de

lodos de flujo ascendente (RALIFA) que tiene una gran facilidad de operación, no ocupa grandes espacios y es de bajo costo (Casarrubias y Hernández, 1996)

Las ventajas de este tipo de tratamiento son (Arvizu, 1981):

- * Se puede estabilizar hasta un 80% de materia biodegradable
- * Los requerimientos nutrimentales de nitrógeno y fósforo se reducen
- * Como no se requiere oxígeno, la velocidad de digestión no se limita por la transferencia de este elemento
- * Se reducen los requerimientos de energía por el proceso
- * El lodo producido es totalmente estable y útil (y en menor cantidad) y no presenta problemas graves de manejo

Las desventajas son:

- * La necesidad de una relativa alta temperatura requerida para una operación óptima
- * La lenta velocidad de crecimiento de las bacterias productoras de metano
- * La limitación de la velocidad a la cual el sistema puede ajustarse a los cambios de alimentación, temperatura y otras condiciones de operación como consecuencia del punto anterior
- * Para residuos de baja concentración de sustancias biodegradables solubles se limita el uso de este proceso por su lentitud

1.6 OBJETIVOS

Objetivo general: Aislar moléculas orgánicas peligrosas del influente y efluente de un bio-reactor anaerobio que degrada agua de proceso del cempasúchil y caracterizarlas por métodos espectroscópicos para determinar el por que de su baja biodegradabilidad.

Objetivos particulares: (1) Separar compuestos orgánicos peligrosos del agua residual del cempasúchil por el método de extracción líquido-líquido; (2) Purificar dichos compuestos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y cromatografía en capa fina preparativa (CCFP); (3) Identificar y elucidar los compuestos orgánicos extraídos y separados utilizando técnicas espectroscópicas tales como: Espectroscopía Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopía de Masas (EM).

1.7 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA AISLAR LOS COMPUESTOS DEL CEMPASÚCHIL

Las posibles técnicas utilizadas para obtener compuestos de una fase líquida, en este caso el agua residual, serán las técnicas de separación (destilación y

extracción) y purificación (cromatografía). El agua residual del cempasúchil por sus características, tiene cientos de compuestos. Como no se trata de aislar todos sino sólo una pequeña parte, se tiene que utilizar un método de separación que aisle sólo una fracción del total de compuestos presentes en dicha agua.

Esto último tiene que hacerse, puesto que trabajar con demasiados compuestos puede traer problemas para su separación. Por ejemplo, en las columnas cromatográficas se complicaría el trabajo de separación de las bandas (cromatograma). El método adecuado para este caso será entonces el uso de las técnicas cromatográficas (en algunas de sus variantes), ya que éstas son útiles cuando se trata de separar compuestos con propiedades físicas y químicas semejantes, circunstancia que ocurre con los compuestos que están presentes en el agua residual proveniente del procesamiento del cempasúchil.

1.8 ALCANCES Y LÍMITES

Los alcances y límites en la identificación de los compuestos se presentaron durante el desarrollo del trabajo y se manifestaron en la última fase de éste. Así, cuando se trataba de aislar un sólo compuesto, el cromatógrafo de alta resolución decía que era necesario hacer otra separación. También se presentaron algunos problemas cuando se trataba de obtener una gráfica espectroscópica, ya que la contaminación de los compuestos durante su obtención y manipulación obliga a repetir dicha purificación realizando varias pruebas cromatográficas.

Lo que se trató de alcanzar en el trabajo fue una buena identificación de algunos de los compuestos presentes en el agua residual, de tal manera que dieran información precisa para inferir qué tipo de compuestos están presentes, en general. Ante la imposibilidad de aislar todos y cada uno de ellos o, por lo menos una gran cantidad, se decidió seleccionar aquéllos responsables del olor desagradables de esta agua residual, así como los de estructuras aromáticas.

La principal limitante del trabajo fue el tiempo, ya que tratar de ambicionar una meta tan grande como lo sería el aislamiento de muchos compuestos implicaría por necesidad una gran cantidad de tiempo, sin contar con las metodologías para alcanzar una buena identificación de los mismos. La cantidad de compuestos obtenidos del agua residual sería un avance ante la situación anterior, en la que se desconocía por completo alguno de los cientos de compuestos que están presentes en ella. Esto último se menciona, ya que antes de este trabajo, no existía ninguna institución que hubiera hecho un estudio de este tipo para el agua residual del cempasúchil.

Capítulo 2

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los métodos de separación de mezclas sencillas de sustancias químicas suelen ser sobradamente conocidos, pero cuando los componentes individuales de una mezcla se van pareciendo en las propiedades físicas o químicas, aumenta la dificultad de separación.

En química y biología es frecuente y a veces necesario separar, aislar, purificar e identificar los componentes de mezclas muy complejas, a diferencia de las que requieren de simples separaciones físico-mecánicas para separar mezclas sencillas como lo podrían ser limadura de hierro y azufre. Así por ejemplo, cuando sucede una hidrólisis de una proteína, los componentes individuales de la mezcla resultante son muy parecidos entre sí en sus propiedades físicas y químicas y, por lo tanto, la dificultad de identificar las propiedades de cada componente es mayor.

Sería casi imposible conseguir separar los componentes por un método como la cristalización fraccionada. Sin embargo, es posible conseguir una magnífica separación mediante la cromatografía. *La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento* (Abbot y Andrews, 1983).

El biólogo ruso Tswett en el año de 1906, fue probablemente la primera persona que advirtió las posibilidades de este método. Tswett logró separar los pigmentos de las hojas por percloración de su solución en éter de petróleo a través de una columna de vidrio rellena de sulfato de calcio pulverizado y con una llave en el extremo inferior. La materia colorante apareció dividida en zonas diversamente coloreadas (Devore y Muñoz, 1984) (ver Fig. 1).

Para describir este fenómeno se introdujo el término *cromatografía*, que literalmente quiere decir "escribir en color". *Esta separación no tiene que ver nada con el color de los compuestos, sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos hacia el yeso*. Los constituyentes de la sustancia se separan de arriba a abajo de la columna por orden de adsorbabilidad decreciente y lo cual da el *cromatograma*. Este experimento fue, sin duda, la primera aplicación de una columna de adsorción cromatográfica (Devore y Muñoz, 1984).

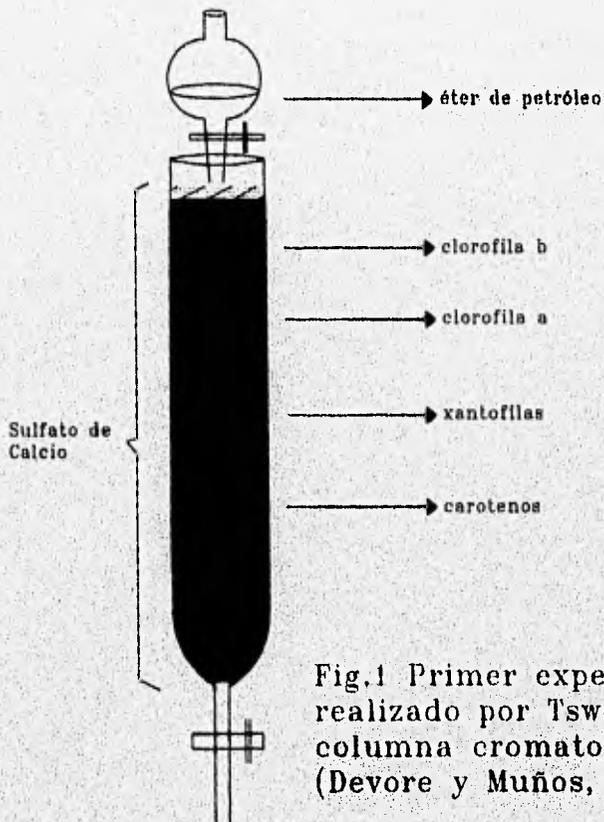


Fig.1 Primer experimento realizado por Tswett en una columna cromatográfica (Devore y Muños, 1984)

Sin embargo, en las columnas empacadas es muy difícil obtener una identificación formal con cantidades muy pequeñas de las sustancias a separar. A mediados de este siglo se describió la cromatografía en papel, en la que las separaciones se llevan a cabo (principalmente por reparto) sobre tiras de dicho material, en un sistema de "columna abierta". *Con la cromatografía de papel se pueden detectar e identificar de una manera segura cantidades del orden de microgramos de la mayoría de los compuestos.*

Estas técnicas han sido ampliadas con dos métodos nuevos. Primeramente, el concepto de "columna abierta" se ha extendido por la introducción de la cromatografía en capa fina, en la que las separaciones se realizan en un material soportado sobre placas de vidrio.

Una consecuencia lógica de estas dos técnicas fue la cromatografía de gases, en la que un gas reemplaza al disolvente líquido. Debido a esto, las separaciones han de realizarse dentro de una columna cerrada para la separación de mezclas de gases, líquidos o sólidos volátiles. Los primeros experimentos de este tipo se realizaron en 1952 (Abbot y Andrews, 1983).

En la actualidad casi no hay campo de la química o de la biología en el que no se use la cromatografía en alguna forma. Por ejemplo, el análisis por cromatografía de papel se usa en medicina forense (en la detección de venenos), en el examen de tejidos biológicos y sus procesos químicos relacionados (procesos metabólicos) y en los estudios estructurales de moléculas complicadas, tales como los carbohidratos, proteínas y fenoles complejos de plantas, por ejemplo.

La cromatografía es, naturalmente, un técnica tan importante en la química inorgánica como en la orgánica. Fue el primer método que se empleó para separar los productos obtenidos en la fisión nuclear antes que se desarrollaran las resinas de intercambio iónico. En cada una de las técnicas cromatográficas antes mencionadas es posible obtener separaciones casi imposibles de conseguir de otra manera. *En cada caso la separación está basada en un proceso de reparto múltiple o uno continuo de adsorción-desorción* (Abbot y Andrews, 1983).

Para que haya cromatografía es necesario que en un sistema cromatográfico se multipliquen muchas veces las pequeñas diferencias del coeficiente de reparto o en la adsorción-desorción de cada uno de los componentes de una mezcla. Cuanto más grande sea este factor de multiplicación, con mayor facilidad se separarán los componentes. Siguiendo este criterio, se compara muy a menudo a la cromatografía con la destilación fraccionada y se aplica el concepto de plato teórico (donde existe

un equilibrio entre el vapor ascendente y el líquido que cae). Naturalmente, a mayor número de platos, mayor es la eficiencia de separación de la columna.

Análogamente, puede considerarse que un sistema cromatográfico está formado por una serie de platos hipotéticos, siendo cada uno de ellos una unidad dentro del sistema en la que hay un equilibrio entre el disolvente y el material empleado. La ventaja principal de la cromatografía es que se puede conseguir una alta eficiencia debido al gran número de platos teóricos. Debido a que en el sistema cromatográfico se establece el equilibrio muy rápidamente, se pueden llevar a cabo buenas separaciones en tiempos muy cortos.

De la información anterior, se puede deducir que los métodos cromatográficos de separación se distinguen por su alta *selectividad*, que es su capacidad para realizar separación entre componentes de propiedades químicas y físicas muy similares. El intervalo de materiales que pueden ser procesados por esta metodología cubre un espectro completo de pesos moleculares, desde el hidrógeno hasta las proteínas. Las técnicas cromatográficas han sido usadas rutinariamente para el análisis químico desde la década de los 50's y para análisis automatizados de corrientes de procesos, en control de procesos (*procesos cromatográficos*) desde 1961.

Su uso como un proceso de separación comercial es a menudo llamado *producción cromatográfica a gran escala* (o algunas veces, confusamente, procesos cromatográficos) para distinguirlo de su similar más pequeño (que se utiliza a escala de laboratorio) llamada *cromatografía preparativa* (ver Fig. 2). La producción cromatográfica es una entrada relativamente nueva para el tipo de procesos de separación generalmente usados por los ingenieros químicos. Su uso se ha incrementado como una demanda para preparar materiales de gran pureza y elevado costo.

2.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

2.2.1 CROMATOGRAFÍA DE REPARTO

La cromatografía de reparto, como su nombre lo indica, está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el reparto existente entre la fase móvil (disolvente) y la fase estacionaria, soportada sobre un sólido adecuado. El disolvente puede ser un líquido (cromatografía líquido-líquido) o un gas (cromatografía gas-líquido). Aunque desde el punto de vista teórico hay mucha relación entre las dos técnicas, los detalles prácticos son muy diferentes (Abbot y Andrews, 1983)

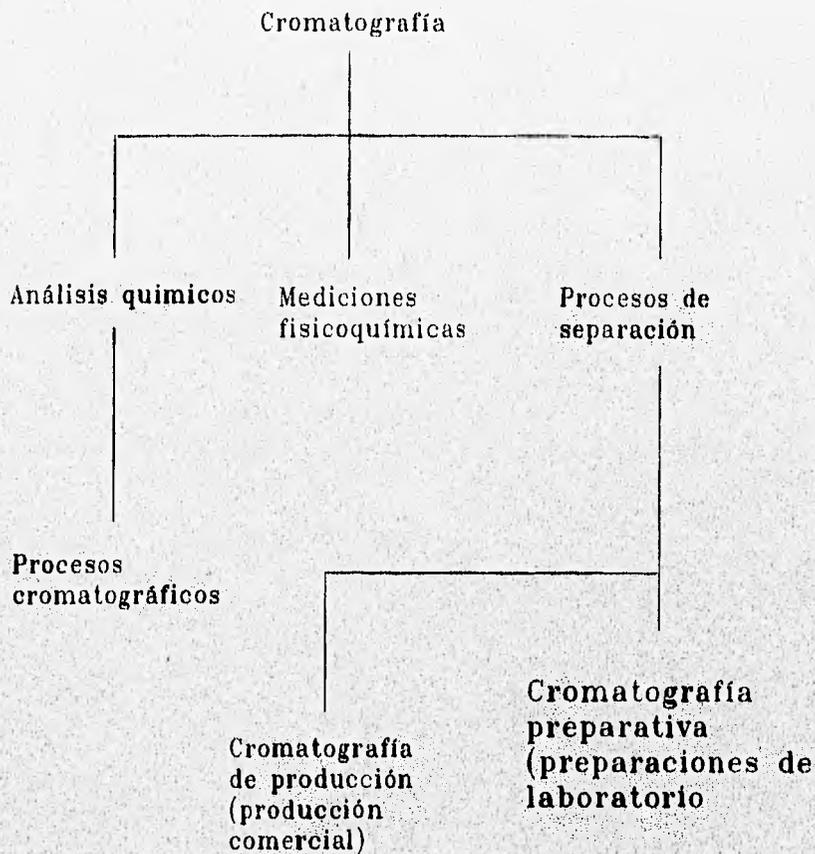


Fig.2 Usos de la cromatografía
 (Abbot y Andrews, 1983)

2.2.1.1 Cromatografía líquido-líquido

Las técnicas de este tipo se llevan a cabo sobre celulosa o gel de sílice húmedos, pudiendo realizarse en forma de tira de papel, capa fina o columna. *El medio en cada caso actúa como soporte del agua, por lo que este tipo de cromatografía se emplea fundamentalmente para la separación de sustancias solubles en la misma.*

En la cromatografía de reparto (p. ej. en papel), el único factor que influye en el movimiento de un compuesto a lo largo del papel es la solubilidad relativa de éste en la fase móvil y en la estacionaria. Las sustancias que son solubles sólo en el disolvente emigrarán a la misma velocidad que la parte frontal de éste, mientras que las que son solamente solubles en agua, permanecerán en el origen de la cromatografía (ver Fig. 3).

En la cromatografía sobre papel influyen otros factores sobre la velocidad de emigración, como por ejemplo, la adsorción. *Es importante indicar que el reparto de una sustancia entre dos disolventes inmiscibles no se afecta por la presencia de otras sustancias disueltas.*

2.2.1.2 Cromatografía gas-líquido (CGL)

Los principios teóricos de la cromatografía gas/líquido son completamente análogos a los descritos anteriormente. Las separaciones son función del reparto de las moléculas de soluto entre un líquido, dispuesto sobre un sólido apropiado, y el flujo de gas del sistema. Prácticamente, el líquido debe poseer muy baja volatilidad, por lo que no puede emplearse el medio acuoso de la cromatografía líquido/líquido. En esta técnica se necesita una gran superficie específica para facilitar el reparto entre las superficies líquida y gaseosa, el soporte más utilizado y que reúne esta característica es la celita.

La elección del líquido para la cromatografía gas/líquido depende de la naturaleza de las sustancias a separar y de la temperatura a la que se va a realizar la separación. Generalmente la fase estacionaria se elige con una estructura análoga a la de las sustancias que se quiere separar. Se dispone de una gran cantidad de sustancias que faciliten esta elección, incluyendo amidas, aminas, hidrocarburos y grasas, siliconas, ceras, alcoholes, éteres, polímeros, poliésteres y muchos más. Algunos soportes combinan las propiedades de la fase sólida y líquida en una sola.

2.2.2 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL

La cromatografía de filtración sobre gel es un tipo particular de cromatografía líquido-líquido, que se utiliza en la separación de sustancias que poseen volúmenes moleculares diferentes. En el año de 1959 se introdujo como técnica de laboratorio con la creación del *Sephadex*, que se obtiene a través de un polisacárido (la dextrana) sometido a un proceso para que dé una mayor uniformidad tridimensional. El producto se presenta en forma de esferillas (Abbot y Andrews, 1983).

Por su gran cantidad de grupos OH, el producto tiene una gran afinidad por el agua y se hincha en presencia de la misma formando un gel semitransparente. Las sustancias cuyo tamaño molecular es superior al de los mayores poros de gel hinchado (lo que determina el *límite de exclusión*) no penetran en el interior de este y pasan en el líquido a través del lecho, emergiendo como las primeras en la columna.

Las moléculas más pequeñas sí pueden penetrar y entre el líquido exterior y el interior de las partículas del gel se logra un reparto de moléculas, siendo superior el porcentaje de las mismas en el último. *Las moléculas que emergen de la columna siguen un orden decreciente respecto a los tamaños moleculares.* En la Fig. 4 se representan tres etapas de la separación de grandes moléculas de otras menores.

2.2.3 CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

Las diferencias de comportamiento en la adsorción-desorción de sustancias contenidas en un disolvente móvil (un líquido o un gas), sobre un sólido estacionario se utilizan para conseguir la separación de los componentes de una mezcla. *La adsorción es un fenómeno de superficie*, que se manifiesta por un aumento de concentración en la interfase que rodea el medio estacionario.

2.2.3.1 Cromatografía líquido-sólido (CLS)

La mayoría de los sólidos empleados como adsorbentes en la cromatografía de columna o de capa fina son óxidos metálicos, óxidos hidratados y sales. Los más utilizados son la gel de sílice y la alúmina. En determinados casos también se emplean otros adsorbentes especiales como el carbón activo y el polvo de poliamida.

En el sentido cromatográfico el término *adsorción* se limita a las interacciones que implican enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas. Cuando las interacciones son iónicas el proceso se denomina intercambio iónico.

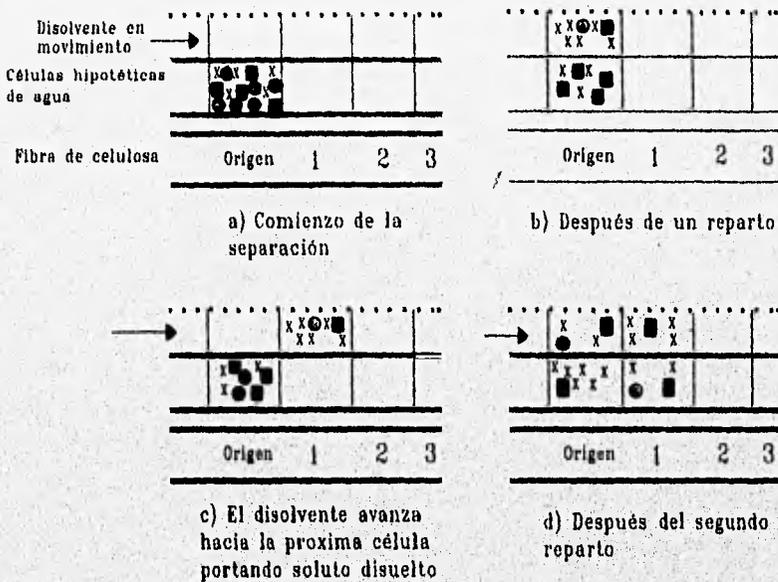


Fig.3 Cromatografía de reparto
 (Abbot y Andrews, 1983)

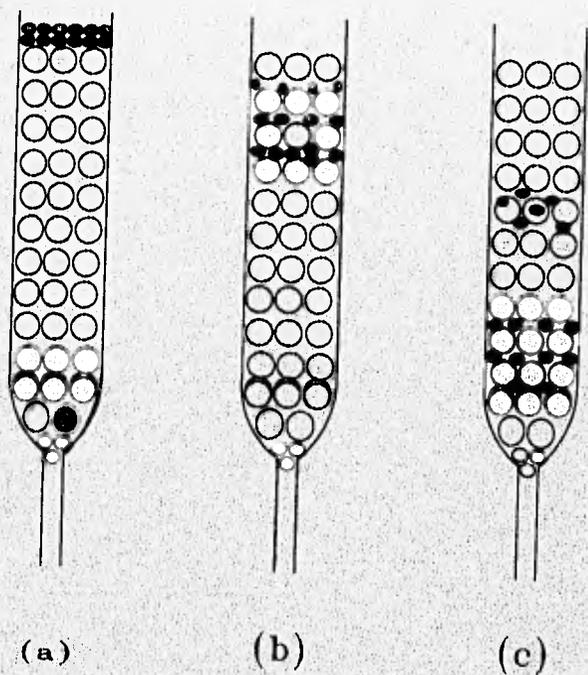


Fig.4 Cromatografía de filtración sobre gel
(Abbot y Andrews, 1983)

Los centros adsorbentes o *activos* provienen principalmente de los defectos (grietas, filos, etc.) de la red cristalina, donde las fuerzas electrostáticas están proyectadas parcialmente hacia el exterior. La adsorción se da debido a la interacción de estas fuerzas con las interiores del soluto. A mayor separación de cargas del soluto (mayor momento dipolar), mayor será la adsorción. *Desde el punto de vista práctico, la cromatografía líquido/sólido se aplica en la separación de sustancias de media o baja polaridad* (Abbot y Andrews 1983).

En cualquier fenómeno de adsorción *influyen tres variables independientes*. Estas son *el adsorbente, el disolvente y las sustancias cromatográficas*. Las separaciones sobre adsorbentes depende de la existencia del equilibrio entre las moléculas adsorbidas en la fase estacionaria y las que están libres en el disolvente, moviéndose las moléculas individuales entre las dos fases. *Si las moléculas de un componente particular tienen una elevada afinidad por el adsorbente pasarán muy lentamente, mientras que las de otro componente con menos afinidad lo harán más rápido* (Abbot y Andrews, 1983).

La regla general es elegir la polaridad del disolvente análoga a la de la muestra a emplear y en la mayoría de los casos, se seleccionan adsorbentes poderosos (activos) para sustancias no polares y adsorbentes menos activos para sustancias más polares.

Para facilitar la elección del sistema, se cuentan con listas de adsorbentes y disolventes ordenados de menor a mayor polaridad (actividad o poder eluyente, respectivamente). Una de éstas se ha elaborado con base en los conocimientos prácticos y se presenta en la tabla 4.

Aunque este tipo de relaciones son muy útiles, se debe tener cuidado especialmente con los disolventes, ya que a veces se llegan a invertir los resultados entre dos disolventes determinados, en las mismas condiciones.

Virtualmente puede emplearse cualquiera líquido como disolvente en la cromatografía líquido/sólido, pudiendo combinarse mezclas de dos, tres e incluso cuatro líquidos de polaridad diferente. De esta manera, el número de disolventes disponibles es mucho mayor que el de adsorbentes.

En la práctica, sólo se emplean dos adsorbentes, la gel de sílice y la alúmina, desarrollando la separación a través del empleo del disolvente apropiado o cambiando la polaridad del adsorbente por adición de agua. *En capa fina se emplean, generalmente, partículas mucho más finas que en cromatografía de columna*. Hay que tener en cuenta que *el adsorbente, al tener una superficie*

especifica elevada, actúa frecuentemente como un catalizador eficaz, pudiendo llevar a cabo en algunas circunstancias, durante el desarrollo, cambios importantes en los componentes de una mezcla (Abbot y Andrews, 1983).

TABLA 4. Poder de los adsorbentes y disolventes (Abbot y Andrews, 1983)

Sustancias adsorbentes por orden de menor a mayor poder de adsorción	Disolvente por orden de menor a mayor poder eluyente
Azúcar, almidón	Hexano, éteres de petróleo
Inulina	Heptano
Talco	Ciclohexano
Carbonato de sodio	Tetracloruro de carbono
Carbonato de potasio	Benceno
Carbonato de calcio	Tolueno
Magnesia	Cloroformo
Gel de sílice activada	Éter dietílico
Alúmina activada	Acetato de etilo
	Piridina
	Acetona
	Propanol
	Etanol
	Metanol
	Agua
	Mezclas de ácidos, bases con agua, alcoholes o piridina

La cantidad de muestra en la cromatografía de adsorción es muy importante, ya que el poder adsorbente de la superficie disminuye considerablemente con el incremento de la muestra, ya que se ocupan primero los centros más activos. *Una razón para el empleo de gel de sílice es que posee una capacidad de adsorción muy elevada (lo que posibilita la separación de grandes cantidades de mezcla).*

2.2.3.2 Cromatografía gas-sólido (CGS)

La cromatografía de adsorción de gases se emplea principalmente para la separación de éstos, y muchos de los medios empleados tienen un alcance limitado. Algunos tienen mayor aplicación, como las esferillas porosas de sílice. Debido a que la retención de sustancias volátiles decrece al disminuir la superficie específica, la separación de gases de líquidos de elevado punto de ebullición puede conseguirse

escogiendo el tipo apropiado. Calentado las perillas con una pequeña cantidad de fase líquida es posible combinar la separación por adsorción y por reparto.

2.2.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Las separaciones de intercambio iónico se llevan a cabo con materiales especiales (estructura porosa e insolubles). Estos contienen grupos reactivos que están asociados a iones lábiles que se intercambian con los del medio que les rodea. Este es el único fenómeno que ocurre en el material durante todo el proceso, que invariablemente tiene lugar en medio líquido (generalmente acuoso) (Abbot y Andrews, 1983).

Como su nombre lo indica, la cromatografía de intercambio iónico se emplea en la separación de sustancias iónicas, tanto orgánicas como inorgánicas, de polielectrólitos, como enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes.

Por lo general se emplean tres tipos de materiales, resinas, geles y celulosas de intercambio iónico. Su principal diferencia se debe a la naturaleza de los grupos cambiadores incorporados a cada uno y principalmente a la microestructura.

2.3 CONCEPTO DE POLARIDAD

El concepto de polaridad es importante en cromatografía por dos motivos. Por una parte *la polaridad influye notablemente en el comportamiento de una sustancia en disolución y, por otra, el poder adsorbente sobre una molécula aumenta directamente con la polaridad de la misma.* Las sustancias sólidas tienden a disolverse en líquidos de polaridad semejante y los líquidos son miscibles con otros de polaridad análoga.

La polaridad de una molécula depende de la naturaleza de los átomos de que está constituida y de la forma de la misma. Así, grupos tales como -F, -OH, -NH₂, -Cl (decreciendo en este orden) tienden a comunicar polaridad a la molécula, mientras que la introducción de grupos -CH₂- en compuestos orgánicos tienden a disminuirla. Análogamente, la polaridad se favorece por la asimetría de las moléculas (Abbot y Andrews, 1983).

También es preciso saber que *la polaridad de las sustancias aumenta en disolventes polares, por lo que la polaridad de los componentes de una mezcla puede*

ser mucho mayor en la cromatografía líquido/líquido que en la gas/líquido (Abbot y Andrews, 1983).

2.4 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA UTILIZADOS EN EL PROYECTO

En el trabajo se utilizaron 3 tipos de cromatografía: cromatografía de columna, de capa fina y de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés o CLAR, por sus siglas en español).

2.4.1 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

En la cromatografía de columna, *las separaciones pueden realizarse por reparto, adsorción o intercambio iónico*; de igual manera, *son numerosos los adsorbentes que se pueden emplear*. Basándonos en la información que se tiene sobre los diferentes métodos cromatográficos, las diferentes clases de adsorbentes, el concepto de polaridad y sabiendo de antemano que se obtendrían sustancias polares y medianamente polares, se determinó utilizar la cromatografía líquido/sólido (cromatografía de adsorción). Así también, se determinó utilizar adsorbentes activos para este tipo de sustancias.

Para el presente trabajo se utilizaron 4 columnas cromatográficas, cada una de diferente diámetro dependiendo de la cantidad de compuestos que se esperaban obtener.

Para el agua del cempasúchil antes de ser tratada en el bio-reactor (influyente) se utilizaron 2 columnas, una de 4.5 cm y otra de 2.5 cm de diámetro, suponiendo que en este tipo de agua, al ser el resultado de una degradación biológica, el ensilado, todavía se pueden encontrar una gran cantidad de compuestos. Para el caso del agua que salía del bio-reactor (efluente) se utilizaron 2 columnas, una de 2.5 cm y otra de 1.8 cm de diámetro considerando que al tener ya un tratamiento biológico controlado, el RALLFA, muchos compuestos se degradan o se convierten en otros (biogás) y, por lo tanto, no se esperaba encontrar una cantidad tan grande.

Se procedió a utilizar sílica gel 60 (tamaño medio del poro en Armstrong) con tamaño de grano de 0.2 a 0.5 mm para el relleno de la columna más ancha, así como también sílica gel 70 para el caso de las columnas más delgadas. El tamaño de la columna está determinado por la cantidad de mezcla que se va a fraccionar.

En general, se emplean tres tipos de disolventes, según sea la separación (de reparto, adsorción o intercambio iónico). Para las separaciones por adsorción es

fundamental que los disolventes empleados en la elución sean muy puros, pues de otra manera las impurezas podrían alterar el curso completo del desarrollo.

Con adsorbentes del tipo de la alúmina y de la gel de sílica la intensidad de la adsorción aumenta al crecer la naturaleza polar del material adsorbido, por lo que en estos casos se emplea normalmente un disolvente no polar, por ejemplo, éter de petróleo. Los grupos polares, como los del OH del agua y del etanol, causarían una desorción de la sustancia. Según esto, la elución de la columna puede llevarse a cabo empleando una serie de disolventes en los que vaya aumentando la polaridad. Una serie típica es la que sigue (de menor a mayor polaridad): hexano < ciclohexano < benceno < cloroformo < éter dietílico < acetato de etilo < acetona < etanol < metanol < agua (ver la tabla 4 en la sección de cromatografía líquido/sólido).

2.4.2 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA PREPARATIVA

Las separaciones sobre capa fina se parecen en muchos aspectos a las de papel, pero es posible la elección de muchos más medios, ya que *con esta técnica pueden realizarse separaciones por reparto, filtración sobre gel, adsorción e intercambio iónico*. Las propiedades particulares de la cromatografía en capa fina permiten desarrollar el fraccionamiento en un período de tiempo mucho menor, incluso empleando como adsorbente celulosa, y el desarrollo de la placa es mucho más rápido que el papel. Una razón de esto es el tamaño tan fino de las partículas que constituyen los medios empleados en la cromatografía en capa fina, por lo que se consiguen mejores resoluciones y manchas más compactas.

Se utilizaron cromatoplasas de sílica gel 60 F₂₅₄. Dichas placas tienen dimensiones de 20 x 20 cm, con espesor de capa de 0.25 mm, con zona de concentración y base de vidrio (la F indica la adición de un indicador fluorescente y el subíndice la longitud de onda de excitación del indicador). Si se colocan estas cromatoplasas en una lámpara de luz ultravioleta, los compuestos no visibles al ojo humano aparecerán como manchas oscuras.

Teniendo en cuenta también la precisión con que se fabrican, se consiguen separaciones reproducibles en la mayoría de los casos. Considerando que el tipo de compuestos que se obtendrían serían la mayoría no polares o medianamente polares, este tipo de placas con un grano relativamente fino sería lo ideal para separar las mezclas de 2 a 3 compuestos.

Se utilizaron también cromatofolios con indicador fluorescente. Este tipo de placas están extendidas sobre una película flexible de metal, y tienen también un aditivo fluorescente como las cromatoplasas. La elección del disolvente para las

cromatoplasmas como para los cromatofolios se elige de la misma manera que en la columna.

2.4.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR o HPLC)

Cuando se han recogido una serie de fracciones de la columna, o bien, se ha obtenido un compuesto de alguna cromatoplasma, el problema es analizar el contenido para saber si en realidad es un sólo compuesto, o bien, sigue siendo una mezcla. Para esto, se puede hacer una análisis continuo donde se conduce un eluyente (que contiene el compuesto o la mezcla) a través de un aparato que mide algunas propiedades de los compuestos que han de separarse.

Muchos compuestos por ejemplo, que son incoloros, absorben luz en la región del ultravioleta. En este caso se bombea el eluyente a velocidad constante a través de una celda con ventanas en ambos lados. Un rayo de luz ultravioleta de determinada longitud de onda pasa a través de la solución y va a caer sobre una célula fotoeléctrica situada en el otro lado. En algunos aparatos, la cantidad de luz que llega a la célula fotoeléctrica se mide automáticamente a intervalos regulares, y los resultados se presentan en un gráfico que lleva la máquina.

La presencia en el eluyente de compuestos que absorben la radiación hará que en la gráfica aparezcan una serie de picos, que indican la situación de cada uno de los compuestos. La fracción que contiene el material que interesa puede determinarse fácilmente consultando el cromatograma.

Si el análisis y la separación se realizan en condiciones cuidadosamente controladas, puede emplearse el cromatograma para obtener resultados cuantitativos. En este trabajo, como primera etapa, los resultados fueron únicamente cualitativos, es decir, interesaba saber cuántos compuestos estaban presentes en la muestra inyectada y no la cantidad de cada uno. La fig. 5 muestra el mecanismo utilizado en un CLAR (HPLC) para el análisis continuo del eluyente.

En el CLAR (HPLC) utilizado en este trabajo, el análisis para saber cuáles son los compuestos presentes en una muestra se realiza automáticamente, debido a que el aparato funciona en su totalidad por medio de la electrónica. El aparato consta de 5 partes:

* Una computadora, desde donde se manda toda la información sobre la muestra mediante un programa ya establecido; asimismo, en ella se recibe la información sobre el análisis de la muestra mediante una gráfica y una tabla en la que se indica el área bajo cada pico.

* Una microcolumna, en la que la muestra inyectada se va separando en los diferentes compuestos que la componen, como en una columna empacada.

* Una bomba que provee la fuerza necesaria para que la fase móvil (mezcla de disolventes) tenga un flujo continuo a través de la columna y con una presión adecuada. Esto se debe a que la columna es tan delgada que se necesita una gran presión para que la fase móvil separe los compuestos.

* Una fase detectora, que consiste en un instrumento que mediante una propiedad física de los compuestos (longitud de onda absorbida, índice de refracción, etc.) los "identifica" y los cataloga como diferentes.

* Una interfase, que es el "traductor" entre la fase detectora y el programa de la computadora. La interfase recibe la señal del aparato detector, transforma su señal eléctrica en otra de diferente tipo y la transcribe en términos de una señal que puede detectar la computadora para que ésta la muestre en forma de gráfica.

En general, la cromatografía es una poderosa pero relativamente cara técnica de separación cuyas ventajas y desventajas necesitan ser evaluadas cuidadosamente. La virtud más obvia de los métodos cromatográficos es su gran fuerza de separación.

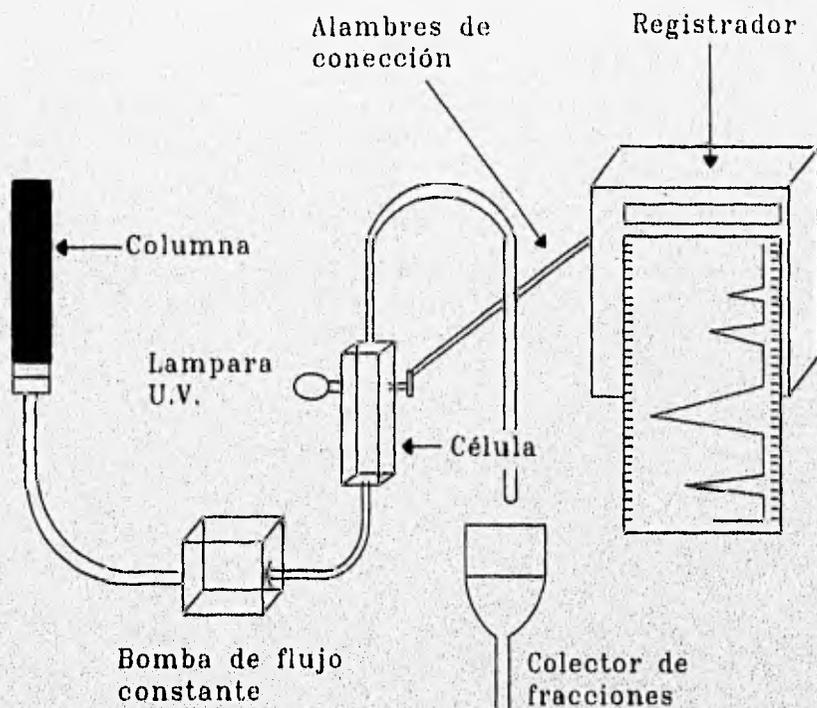


Fig.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución o CLAR (HPLC)

Capítulo 3

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.1 GENERALIDADES

Los compuestos orgánicos se pueden identificar a partir de la información de cuatro espectros: de masas, infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y ultravioleta (Silverstein y Bassler, 1980)

Las pequeñas cantidades de compuestos puros que pueden separarse a partir de mezclas complejas por medio de la cromatografía en fase gaseosa o de la cromatografía de placa fina, representan un reto para el químico dedicado a la identificación y elucidación estructural de los compuestos orgánicos. Estas técnicas tienen dos características: son rápidas y de gran efectividad en cantidades de miligramo y microgramo.

Frecuentemente, las moléculas complejas pueden identificarse debido a que las estructuras parciales son conocidas y, considerando el hecho de que pueden establecerse preguntas específicas, *el proceso más bien es de confirmación que de identificación* (Silverstein y Bassler, 1980).

Sin embargo, en la práctica se presentan dificultades en cuanto al manejo físico de cantidades diminutas del compuesto: atrapamiento, elución de los adsorbentes, remoción del disolvente, eliminación de la contaminación y la descomposición de los compuestos inestables. El agua, el aire, las grasas de tapones, las impurezas de los solventes y los plastificantes son factores de impurificación de las muestras (Silverstein y Bassler, 1980).

En muchos casos, la identificación puede realizarse en una fracción de un miligramo o aún varios microgramos de muestra. La identificación a escala de miligramo es rutinaria. Por supuesto, no todas las moléculas resultan ser igualmente fáciles de trabajar.

Las manipulaciones químicas pueden resultar necesarias. Sin embargo, la información obtenida de los cuatro espectros permitirá lograr una selección inteligente del tratamiento químico y la metodología de los tipos de energía que se pueden aplicar a los productos resultantes. Aún así, la metodología planteada tiene algunas limitantes para dos tipos de espectros. Un espectro de masas depende del grado de volatilidad y de la estabilidad térmica y la solubilidad es un factor limitante para la espectrometría de resonancia magnética nuclear (Silverstein y Bassler, 1980).

Casi desde su principio, ha resultado evidente la utilidad de la espectrometría de resonancia magnética nuclear para el químico orgánico. Sin embargo, la espectrometría de masas ha tenido una historia algo diferente. Elaborada por el físico y utilizada ampliamente por el químico de la industria petrolera, había sido ignorada casi completamente por el químico orgánico interesado en la identificación y elucidación de estructuras.

3.2 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA

La radiación infrarroja se refiere generalmente a la parte del espectro electromagnético comprendida entre las regiones visible y de las microondas. Aún cuando el espectro infrarrojo es característico de toda la molécula, resulta que ciertos grupos de átomos originan bandas a la misma frecuencia o aproximadamente, en forma independiente de la estructura, del resto de la molécula. Es la persistencia de estas bandas características la que permite al químico obtener una información estructural útil mediante la simple inspección y referencia con tablas generalizadas de frecuencias de grupo características (Silverstein y Bassler, 1980).

Una molécula orgánica absorbe la radiación infrarroja con frecuencias menores de aproximadamente 100 cm^{-1} y la convierte en energía de rotación molecular. *La absorción es cuantificada*, siendo así, un espectro de rotación molecular consisten en líneas "discretas" o separadas (Silverstein y Bassler, 1980).

Una molécula orgánica absorbe la radiación infrarroja en la gama de aproximadamente $10\ 000 - 100\text{ cm}^{-1}$ (1-100 m) y la convierte en energía de vibración molecular. Esa absorción también se cuantifica, pero el espectro de vibración aparece como bandas y no como líneas, debido a que un cambio de energía vibracional simple va acompañado de varios cambios de energía rotacional, particularmente las que se presentan entre 4000 cm^{-1} y 666 cm^{-1} (2.5-15 m). *La frecuencia o la longitud de onda de la absorción depende de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces y la geometría de los átomos* (Silverstein y Bassler, 1980).

Las posiciones de banda en los espectros infrarrojos se presentan ya sea como longitudes de onda o como números de onda. El micrómetro o micra ($\mu\text{m}=10^{-6}$ metros) se ha utilizado comúnmente desde hace mucho tiempo como unidad para la longitud de onda en la espectrometría infrarroja, pero recientemente se ha reforzado el uso de su nombre correcto y la palabra micra ha sido sustituida por micrómetro. Actualmente, se utiliza la unidad de número de onda (cm^{-1} , recíproca de centímetro),

pues es directamente proporcional a la energía y porque muchos de los nuevos espectrómetros sofisticados son lineales en la escala de cm^{-1} .

La absorción infrarroja de las moléculas se resume en la tabla de frecuencias de grupo características (ver Tabla 5) (Morrison y Boyd, 1976). Muchas de las frecuencias de grupo varían dentro de un intervalo amplio debido a que las bandas se originan a partir de vibraciones de interacción complejas dentro de la molécula. Sin embargo, las bandas de absorción representan fundamentalmente a una forma vibracional simple. Por ejemplo, las bandas de absorción que se derivan de las formas de alargamiento C-H, O-H y -C=O permanecen dentro de regiones relativamente estrechas del espectro.

Algunos detalles importantes de la estructura pueden determinarse al conocer la posición exacta de una banda de absorción dentro de estas regiones estrechas. Los desplazamientos en la posición de absorción y los cambios en los contornos de la banda, lo cuales acompañan a los cambios del medio molecular, también pueden sugerir detalles estructurales de importancia.

El espectrofotómetro infrarrojo moderno de doble haz consta de cinco secciones principales: fuente (radiación), área de muestra, fotómetro, gratícula (monocromador) y detector (termopar) (Silverstein y Bassler, 1980).

3.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Un espectrómetro de masas bombardea una sustancia bajo investigación con un haz de electrones y registra cuantitativamente el resultado a modo de un espectro de fragmentos de ion positivo. Este registro corresponde al espectro de masas. La separación de los fragmentos de ion positivo tiene como base la masa (estrictamente, la relación masa/carga) (Silverstein y Bassler, 1980)).

Los espectros de masas se obtienen rutinariamente a una energía del haz de electrones equivalente a 70 electrón-volts. El fenómeno más sencillo que se presenta es la remoción de un electrón simple de la molécula en fase gaseosa por parte de un electrón (del haz de electrones) para formar un ion molecular padre (M^+), éste representa el radical catión. El espectrómetro de masas *clasifica* estos cationes con base en su relación masa/carga o relación m/e . Como para propósitos prácticos la carga de los iones es +1, esto equivale a clasificarlos con base en sus masas. Además, imparte a estos iones moleculares un excedente grande de energía, el necesario como para romper los enlaces covalentes que hacen que la mayoría se *fragmenten* (Solomons, 1988).

TABLA 5. Frecuencia características de absorción infrarroja* (Morrison y Boyd, 1976)

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencia cm ⁻¹
C-H	Alcanos	2850-2960
		1350-1470
C-H	Alquenos	3020-3080 (m)
		675-1000
C-H	Anillos aromáticos	3000-3100
		675-870
C-H	Alquinos	3300
C=C	Alquenos	1640-1680 (v)
C≡C	Alquinos	2100-2260 (v)
-C=C-	Anillos aromáticos	1550,1600 (v)
C-O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1080-1300
C=O	Aldehidos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690-1760
O-H	Alcoholes monómeros, fenoles	3610-3640 (v)
	Alcoholes con puente de hidrógeno, fenoles	3200-3600 (ancha)
	Ácidos carboxílicos	2500-3000 (ancha)
N-H	Aminas	3300-3500 (m)
C-N	Aminas	1180-1360
C≡N	Nitrilos	2210-2260 (v)
-NO ₂	Nitrocompuestos	1515-1560
		1345-1385

* Todas las bandas intensas, salvo las marcadas: m, moderadas; v, variable.

El espectrómetro de masas acelera iones a través de una serie de rendijas, un campo magnético ejerce influencia sobre estos iones con una m/e específica, que siguen la trayectoria de la curvatura del tubo y, en este momento, los iones están "en registro". Al estar en registro, los iones pasan a través de otra rendija e inciden sobre un colector de iones donde se mide su intensidad. *Esta medida de la intensidad es la medida de la abundancia de los iones con una relación m/e específica* (Solomons, 1988).

Existen dos categorías importantes de espectrómetros de masa de reflexión magnética: el de baja resolución y el de alta resolución. Los instrumentos de baja resolución pueden definirse arbitrariamente como los instrumentos que separan masas unitarias hasta de m/e 2000. Los espectros de masa unitaria se obtienen por

medio de estos instrumentos. Los de alta resolución pueden separar dos iones que difieren muy poco en sus masas. Algunos espectrómetros de masas son tan sensibles que pueden detectar la presencia de un solo ion (Silverstein y Bassler, 1980).

El espectro de masas es una representación de las masas de los fragmentos cargados positivamente (incluyendo el ion padre) en función de su concentración relativa. El pico más intenso del espectro, denominado pico base, tiene asignado un valor de 100% y las intensidades (altura x factor de sensibilidad) de los otros picos, incluyendo el pico padre, se indican como porcentajes del pico base. Evidentemente, el pico del ion molecular o el pico padre pueden constituir ocasionalmente el pico base (Solomons, 1988).

La representación del espectro puede ser tabular o gráfica. La gráfica tiene la ventaja de presentar modelos que, cuando se tiene experiencia, pueden reconocerse rápidamente (Morrison y Boyd, 1976).

3.4 ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) representa básicamente otra forma de espectrometría de absorción, semejante a la espectrometría infrarroja o ultravioleta. Bajo condiciones adecuadas, una muestra puede absorber radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia a frecuencias gobernadas por las características de la muestra. La absorción es función de ciertos núcleos en la molécula. Una gráfica de las frecuencias de picos de absorción en función de las intensidades de pico es lo que constituye el espectro de RMN (Silverstein y Bassler, 1980).

Disponiendo de cierto dominio de la teoría básica, la interpretación de los espectros de RMN por simple inspección normalmente es factible con mayor detalle a diferencia de los espectros de infrarrojo y ultravioleta (Silverstein y Bassler, 1980).

Todos los núcleos llevan una carga. En algunos núcleos, esta carga hace un giro o "spin" en el eje nuclear y esta circulación de la carga nuclear genera un dipolo magnético a lo largo del eje. Como consecuencia de esto, el núcleo del hidrógeno, o protón, tiene propiedades magnéticas (Morrison y Boyd, 1976).

Cuando un compuesto que tiene hidrógeno se coloca en un campo magnético fuerte y, simultáneamente se le irradia con energía electromagnética, los núcleos de hidrógeno del compuesto pueden absorber energía mediante un proceso conocido como *resonancia magnética*. Esta absorción de energía, al igual que todos los

TABLA. 6 Desplazamientos químicos y protónicos característicos (Morrison y Boyd, 1976)

Tipo de protón		Desplazamiento químico, ppm
		δ
Ciclopropano		0.2
Primario	RCH_2	0.9
Secundario	R_2CH	1.3
Terciario	R_3CH	1.5
Vinílico	$C=CH$	4.6-5.9
Acetilénico	$C\equiv CH$	2-3
Aromático	ArH	6-8.5
Bencílico	$ArCH$	2.2-3
Alílico	$C=CCH_2$	1.7
Fluoruros	HCF	4-4.5
Cloruros	$HCCl$	3-4
Bromuros	$HCCBr$	2.5-4
Yoduros	HCI	2-4
Alcoholes	$HCOH$	3.4-4
Éteres	$HCOR$	3.3-4
Esteres	$RCOCH$	3.7-4.1
Esteres	$HCCOOR$	2-2.2
Ácidos	$HCCOOH$	2-2.6
Compuestos carbonílicos	$HCC=O$	2-2.7
Aldehídicos	$RCHO$	9-10
Hidroxislicos	ROH	1-5.5
Fenólicos	$ArOH$	4-12
Enólicos	$C=COH$	15-17
Carboxílico	$RCOOH$	10.5-12
Amino	RNH_2	1-5

procesos que se llevan a cabo a escala atómica o molecular, *está cuantizado*. La absorción de energía no se verifica hasta que la fuerza del campo magnético y la frecuencia de la radiación electromagnética tiene valores específicos (Solomons, 1988).

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de resonancia magnética nuclear (RMN) permiten a los químicos medir la absorción de energía en los núcleos

de hidrógeno. Este instrumento utiliza magnetos muy potentes e irradia la muestra con radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia .

Los espectrómetros de resonancia magnética nuclear generalmente están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante mientras se varía la fuerza del campo magnético. Cuando el campo magnético alcanza la fuerza correcta, los núcleos absorben energía y se produce la resonancia. Esto genera una pequeña corriente eléctrica en una bobina de antena que rodea a la muestra. El instrumento amplifica esta corriente y la presenta como una señal (un pico o serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado (Solomons, 1988).

En la tabla 6 (Morrison y Boyd, 1976), se puede observar que para cada protón "diferente" (en sentido de que está asociado, tanto a los campos magnéticos de otros protones como al campo magnético de los electrones que los circundan), se obtendrá una señal diferente. Si el protón está formando parte de un hidrógeno de un compuesto aromático, aparecerá su señal en el *campo bajo* o región aromática, o bien, si forma parte de un compuesto alifático, aparecerá su señal en el *campo alto* o región alifática.

Capítulo 4

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL Y EQUIPO

Material: Columnas de vidrio de diferente diámetro, matraces Erlenmeyer, matraces Kitasato, vasos de precipitado, tubos de ensaye (proveedor Científico); reactivos: Hexano, cloroformo, acetato de etilo (Merck); placas cromatográficas (fina y preparativa), sílica gel grados 60 y 70, malla 400 (Merck); agua residual de cempasúchil (de la planta deshidratadora de Irimbo, Michoacán) antes y después de ser tratada en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA).

Equipo: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector UV/VIS (CLAR o HPLC) (Perkin Elmer); Espectrómetro Infrarrojo (Shimadzu IR-435); Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (Gemini 200-300 MHz); Espectrómetro de masas (Finnigan 4000 GC-MS); Rotavapor (Büchi 011).

4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (influyente)

El primer paso fue tomar una muestra del agua residual del procesamiento de cempasúchil (aproximadamente 500 mL.) de los tambos almacenados en un cuarto frío a 4°C proporcionados por la empresa Bloquimex. Esta agua constituye el influente del bio-reactor (ver Fig. 6). De esta muestra, se colocaron 100 mL en un embudo de separación para obtener las mezclas de compuestos por medio de una extracción líquido-líquido. El procedimiento se realizó para otros 100 mL y así sucesivamente hasta agotar los 500 mL.

Después de agregar el disolvente y el agua residual para tener la mezcla en el embudo de separación, se procede a la agitación continua (aproximadamente 20 min) del embudo, esto con el fin de que el disolvente tenga un contacto suficiente con la fase acuosa y así pueda extraer una mayor cantidad de compuestos. Al terminar la agitación se dejó reposar unos 20 min para que se separaran completamente la fase acuosa y la fase orgánica. Después de haberse separado completamente las dos fases, se colocó la fase acuosa en un frasco grande para que posteriormente pudiera ser reutilizada al extraer otros compuestos con un solvente de mayor polaridad (ver Fig 7).

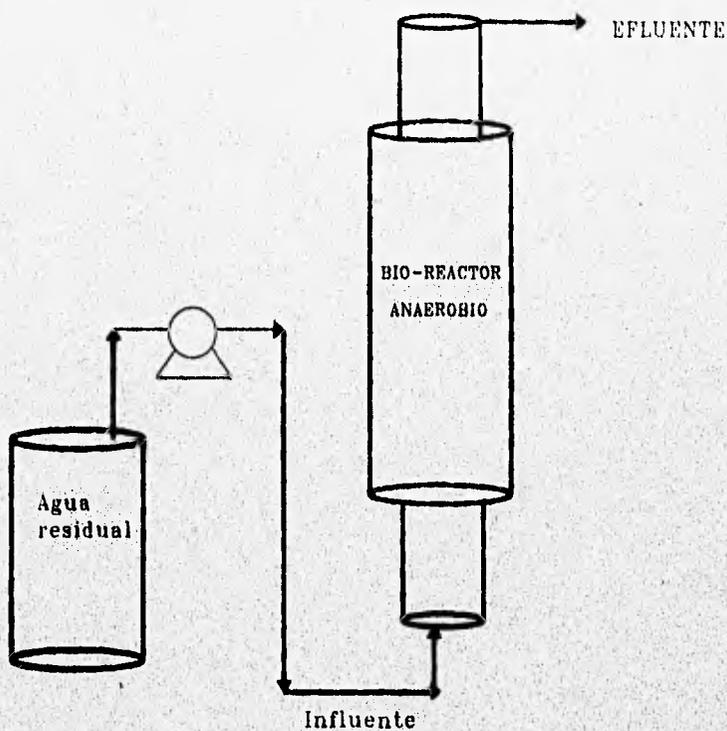
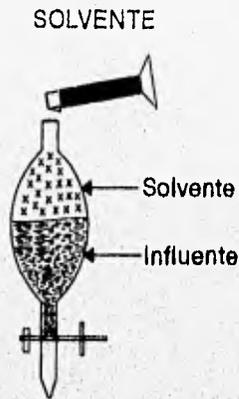


Fig.6 Alimentación del agua residual en el biorreactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente, RALLFA (UASB-reactor por sus siglas en inglés)



1) Adición del agua residual



2) Adición del disolvente



3) Agitación de la mezcla



4) Formación de dos fases

Fig.7 Extracción líquido-líquido

El primer disolvente utilizado en la extracción fue el hexano, uno de los tres utilizados para extraer los compuestos del agua residual. Se tomó al hexano como primer disolvente, ya que es el menos polar de los tres. Este extraerá una pequeña cantidad del total de compuestos presentes en el agua (extracción parcial). Después de hacer la extracción al total de la muestra de agua residual, se realizó el mismo procedimiento, pero ahora con acetato de etilo. Se realizó en este orden para poder tener en dos columnas preparadas para el influente, diferentes mezclas de compuestos. De no realizarse de esta manera, en primer lugar se trabajaría con muchos compuestos en una sola columna. En segundo lugar, no se abarcaría a una parte importante del total de los compuestos presentes en esta agua.

La fase orgánica se colocó en un vaso de precipitados de un litro y enseguida se concentró en un rotavapor. Esto se hace para separar todo el solvente y dejar el extracto con la menor cantidad de éste. Una vez concentrada toda la mezcla de compuestos (extracto) se le agrega celite. El celite sirve para que se haga una masa uniforme del concentrado y sea más fácil su manejo.

Terminado esto, se procedió a empacar las columnas cromatográficas. Debe tomarse en cuenta que una columna bien empacada traerá como consecuencia una buena separación de los compuestos. El empaque de la columna sigue estos pasos: primero, se lava perfectamente la columna de vidrio para que no lleve ninguna impureza, enseguida se toma un pedazo de algodón pequeño y se coloca en la parte final de la columna. Esto se hace para evitar la salida del adsorbente que se agregará a la columna.

El adsorbente agregado es sílica gel, éste se agrega por intervalos y se compacta con una varilla de vidrio. El nivel de sílica gel debe llegar más o menos a las 3/4 partes de la columna y el diámetro de la columna dependerá tanto de la cantidad de compuestos que se supone se extrajeron con el disolvente utilizado, así como el tipo de agua a la que se le hace la extracción (influyente). El proceso del empaque se muestra en la Fig. 8.

Después de haber empacado la columna, se le agrega en la parte superior el concentrado de compuestos y, de la misma manera que la sílica gel, se compacta con una varilla de vidrio, esto con el fin de formar un disco delgado que permita el libre paso de los compuestos. Sobre este disco de extracto se coloca un poco de sílica gel y otro pedazo de algodón, esto para evitar la sobreflotación de los compuestos y hacer más fácil la extracción.

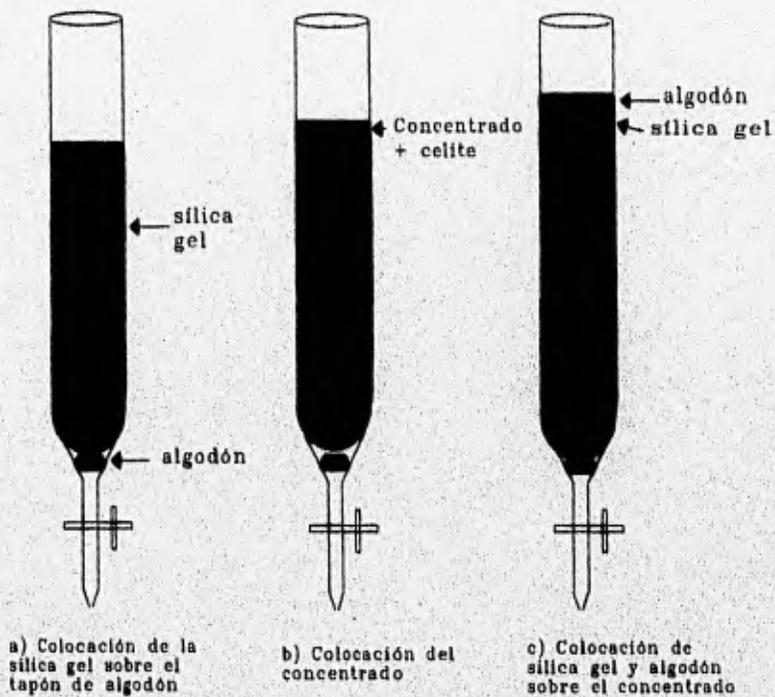


Fig.8 Procedimiento para empacar la columna

Enseguida se inició la separación de las mezclas de compuestos, agregando primero un disolvente de baja polaridad (en este caso hexano) y variando su polaridad de menos a más, agregando mezclas de hexano-cloroformo-acetato de etilo (en forma ascendente del solvente más polar). Así, se comenzó con 100% de hexano y mezclas sucesivas hexano-cloroformo, al llegar al 100% cloroformo se vertieron mezclas sucesivas cloroformo-acetato de etilo, hasta llegar a un 100% acetato de etilo. Con este procedimiento se garantizó un corrimiento uniforme del cromatograma (bandas de compuestos separados, Fig. 1, p.17).

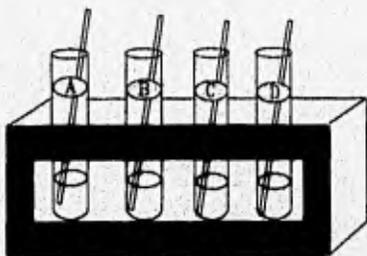
Para el caso del concentrado extraído con hexano se tomó una columna de vidrio con un diámetro aproximado de 2.6 cm y para el concentrado con acetato de etilo se tomó una columna de vidrio con un diámetro aproximado de 5 cm. Para cada mezcla de disolventes utilizada se toma una muestra de unos 50 mL que, posteriormente, se concentra en el rotavapor y se tiene lista para el siguiente paso.

El paso siguiente es aplicar la cromatografía en placa fina. Esto se realiza para identificar visualmente si existe más de un compuesto en las muestras recolectadas de la columna. Para esto, se colocan las placas con un solo punto de concentrado en pequeñas cámaras de elución con algunas mezclas de disolventes de menor a mayor polaridad (ver Fig. 9a y 10a). De esta manera existirá una mejor separación y podrá ser removido cada compuesto de la placa. Si las placas pequeñas indican que existen de 2 a 3 compuestos, entonces se coloca toda la muestra recolectada en una placa más grande y, de igual manera, se colocan en cámaras de elución también más grandes, utilizando una mezcla de disolventes con una polaridad menor que la utilizada para su extracción de la columna, esto para que exista una mejor separación (ver. Fig 9 y 10b).

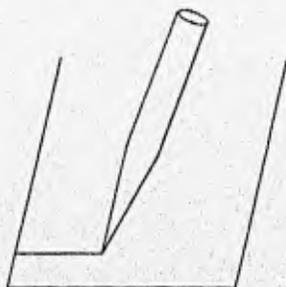
La caracterización del compuesto se inicia con el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN). Esto ayuda a identificar cuántos tipos de protones diferentes existen en dicho compuesto, si son alifáticos, aromáticos o una mezcla de los dos. Los protones identificados en el campo bajo (aproximadamente de 0 a 6 ppm) son compuestos alifáticos y los protones identificados en la región de 6 a 10 ppm son protones aromáticos.

El espectro infrarrojo (IR) se hace para identificar los grupos funcionales que existan en el compuesto.

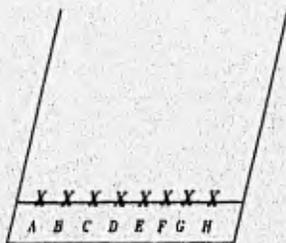
La espectroscopía de masas (EM) se utiliza para la fragmentación del compuesto y la identificación de los porcentajes de cada ion presente en el compuesto así como el peso molecular total del compuesto.



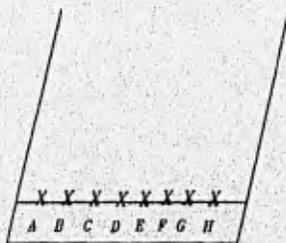
a) Toma de muestras de tubos etiquetados



b) Trazado de línea de referencia



c) Aplicación de muestras en la placa



d) Secado de la muestra aplicada

Fig.9 Aplicación de las muestras en las placas cromatográficas

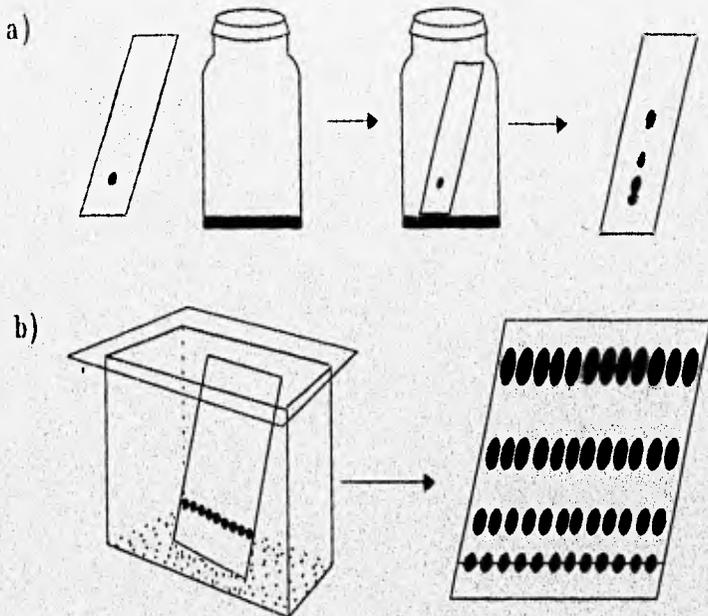


Fig.10 Colocación de las placas en las cámaras de elución

a) Cromatografía en placa fina

b) Cromatografía en placa preparativa

4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (efluente)

El trabajo experimental para obtener los compuestos del efluente comenzó con la recolección del agua del bio-reactor. Esto es, se recolectó agua cuando el reactor tenía relativamente poco tiempo de comenzar a trabajar, y también cuando llegó a una etapa de estabilidad. La coloración del agua iba desde un color rojizo (primeros días), hasta un color negro verdoso (fase estable).

El paso siguiente consistió en hacerle a esta agua residual una destilación simple, con el propósito de eliminar la mayor cantidad de agua que se le agrega con el fin de diluirla antes de introducirla al bio-reactor. este paso es indispensable, ya que de no hacerlo se trabajaría con un gran volumen de sustancia polar como lo es el agua, dificultando entonces la extracción de los compuestos, puesto que éstos se concentrarían en la parte más polar. La destilación se realizó a presión reducida para evitar que el calor descompusiera los compuestos.

El total de agua residual tomada del efluente del bio-reactor fue de aproximadamente 10 litros. El total de residuo "humedecido" fue de aproximadamente 1 litro (ver Fig. 11). Con excepción de este paso, todo el procedimiento fue idéntico al del influente.

Una vez realizado este importante paso se procedió a hacer una extracción líquido-líquido. En esta extracción se emplearon disolventes medianamente polares como el cloroformo, y el acetato de etilo. Dado que se suponía que ya muchos compuestos se habían convertido a biomasa y biogás, se necesitaba un solvente que extrajera la mayor cantidad de aquellos que todavía se encontraban presentes en dicha agua tratada.

Se realizaron extracciones en un embudo de separación de 1 litro con una relación residuo:disolvente de 50:50 en por ciento en volumen agitando después durante unos 15 minutos y renovando la cantidad de disolvente por una segunda ocasión (en menor cantidad), para volver a agitar y obtener una nueva fracción de fase orgánica. Después de este segundo cambio de disolvente, el residuo se sacó del embudo y se procedió a agregar otros 100 mL. El hecho de hacer la agitación en un embudo tan grande fue con el propósito de que existiera una gran área de contacto agua residual-disolvente que mejorara la extracción de los compuestos.

En el embudo de separación se formó tanto una fase orgánica como una acuosa. Lo importante para esta separación fue la fase orgánica, que se extraía del embudo por diferencia de densidades. El total de fase orgánica recolectada fue de 1.5

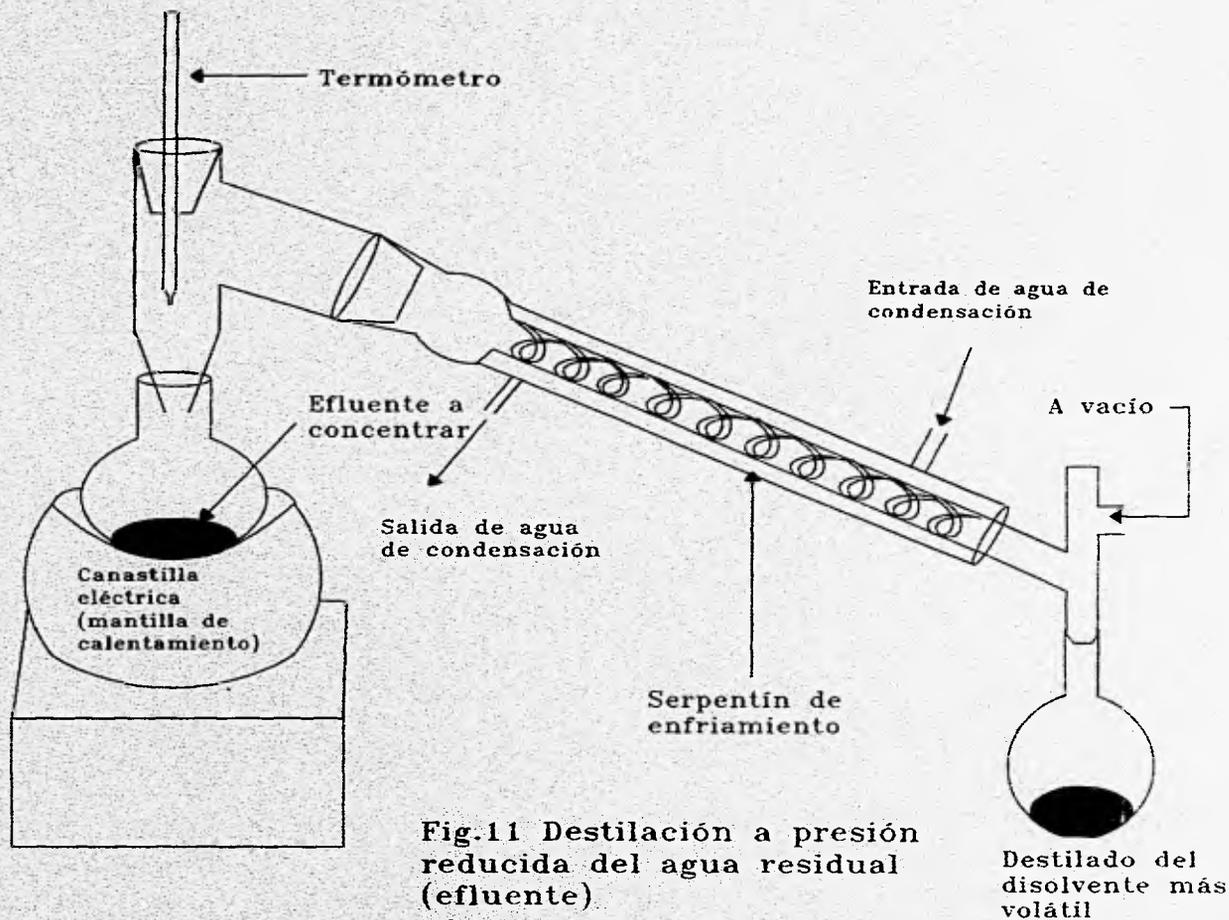


Fig.11 Destilación a presión reducida del agua residual (efluente).

litros. Esta operación se realizó tanto para el cloroformo como para el acetato de etilo.

Una vez obtenida la fase orgánica se procedió a concentrarla para eliminar la mayor cantidad de disolvente posible y así, tener solamente el extracto de la mezcla de compuestos presentes en el agua residual. Para este paso se utilizó un rotavapor en el cual se concentró la fase orgánica hasta un punto casi de sequedad, todo el disolvente recuperado fue reutilizado.

Estando el extracto cuasifluido, se vertió en un vaso de precipitado y se lavaron las paredes del recipiente del rotavapor con algo de disolvente para obtener la mayor cantidad de extracto posible. Estando ya en el vaso, se le aplicó calor por medio de una parrilla en una campana hasta que se eliminó la totalidad del disolvente y el extracto presentó una consistencia muy viscosa. Esta sustancia viscosa que contenía los compuestos orgánicos presentes en el agua residual se mezcló con celite y una tierra diatomea para hacerla consistente y poderla empaquetar. Su aspecto fue el de un "polvo humedecido", fácil de transportar y sin los riesgos que tiene un líquido.

El paso siguiente fue el de empacar las columnas de donde se obtendrían los diferentes compuestos. Para esto se prepararon dos columnas, cada una contendría una mezcla de compuestos obtenidos del agua residual por medio de disolventes diferentes. La selección de la columna (dimensiones), dependió de la cantidad de compuestos que se pensaban obtener, tanto por el tipo de agua tratada (efluente), así como por el disolvente utilizado. La elección de un disolvente de mediana polaridad extraería una cantidad considerable de compuestos del agua, de los que ya se había convertido una parte en el tratamiento en el bio-reactor (a biomasa y biogás).

Las columnas se empacaron con sílica gel. Una columna se empacó a una altura de aproximadamente $3/4$ partes (extracción con acetato de etilo). El empaque a esa altura fue con el fin de dejar un espacio para verter el disolvente. La columna empacada a sus $3/4$ fue más delgada que la empacada a las $2/3$ partes, ya que se supuso que el acetato es un poco más polar y extraería, por lo tanto, más compuestos y, para ello, se necesitaba entonces una columna con un diámetro un poco mayor.

El empaquetamiento se hizo con gran cuidado, ya que de este paso depende la eficiencia de separación para que la recolección de los diferentes compuestos resulte efectiva. Un mal empaquetamiento que deje huecos o fisuras puede implicar una sobreconcentración en esa región de la columna impidiendo el libre paso de los compuestos.

Una vez empacadas las columnas se puso en la parte superior del empaque el "polvo humedecido" que contenía los compuestos, pero empaquetándolo también de

tal manera que resultara un disco de grosor pequeño para permitir a los compuestos salir libremente con el menor número de obstáculos. Se le agregó a este disco una cantidad de sílica encima con un espesor aproximado de 2 cm. Luego, sobre esta capa de sílica se colocó un pedazo de algodón, para tener un empaquetamiento de la mezcla de compuestos que no se desintegrara ni flotara cuando entrara en contacto con los disolventes.

Una vez preparada la columna, se procedió a verter los disolventes para extraer los diferentes compuestos. Se empezó por el disolvente de menor polaridad (hexano) vertiéndolo casi hasta el tope de la columna. Después, se abrió la llave para que comenzará a correr el solvente hasta que saliera por la parte inferior. Éste se recibió en un matraz Erlenmeyer. Si se observaba alguna banda que corriera por la columna, se continuaba el proceso. En caso contrario, se cambiaba de polaridad aumentando ésta con la adición de un disolvente más polar (cloroformo). En todos los casos, el disolvente se recirculaba después de destilarlo en el rotavapor.

En el caso del líquido que se recibía, se muestreaba con cromatografía de placa fina para saber si existía algún compuesto (en el caso de ser incoloro). En el caso de aparecer un color a simple vista, por muy tenue que fuera éste, también se muestreaba para saber cuántos compuestos estaban presentes. Para ello, se colocaba la placa fina en varias cámaras de elución pequeñas con diferentes concentraciones de disolventes (hexano 100% y hexano:cloroformo, 80:20, 60:40, y 50:50). Si no se veía claramente alguna mancha que indicara la presencia de compuestos, se introducía la placa a una cámara de yodo para ser revelada.

En algunas ocasiones no fue posible determinar ningún compuesto en la cromatografía de placa fina debido a los colores bastante claros que se desvanecían al contacto con el aire y por los cambios de color debido a la luz. Cuando esto sucedió, se procedió a utilizar placas más grandes con un espesor mayor y con base de vidrio pero con la misma forma rectangular. Sólo en estas se pudieron detectar los compuestos presentes en el líquido recibido en el matraz.

En el caso de que la cromatografía de placa fina indicara la presencia de un compuesto o una mezcla de 3 o más compuestos, se concentraba el líquido obtenido y se utilizaba la cromatografía de placa fina preparativa. Esta consiste en placas con base de vidrio, de forma cuadrada, más grandes y de mayor grosor de capa de sílica, donde se ponía el total del compuesto o la mezcla de éstos. Se introducían después a una cámara de elución más grande y con una concentración de disolventes ligeramente menos polar que la empleada en la cámara de elución pequeña para una mejor separación.

Aquí es donde realmente se podía observar la cantidad de compuestos presentes en el líquido obtenido de la columna. Se realizaba el mismo procedimiento que en la columna, es decir, se iba cambiando la polaridad en el caso de que las manchas de los diferentes colores no avanzaran. Se procedía a retirar la placa hasta que la mancha (o alguna de ellas) llegara casi al borde superior de la placa.

Las manchas presentes en las cromatoplasas fueron los compuestos observados a simple vista, o bien, los compuestos observables en el espectro visible. Fue necesario utilizar una cromatografía más fina para poder observar al menos por medio de una gráfica, si el supuesto compuesto aislado no era una mezcla de dos o más. La cromatografía líquida de alta resolución, CLAR (HPLC) fue utilizada para este fin. Si el cromatograma mostraba más de un pico, se procedía a separar el compuesto por medio de otra cromatoplasa con el mismo procedimiento antes mencionado.

Una vez separados los compuestos, por muy tenues que se vieran sus colores, se volvían a introducir al CLAR o HPLC. Si el cromatograma mostraba un sólo pico, el trabajo había terminado, en caso contrario, se repetía el procedimiento.

Una vez obtenidos los diferentes compuestos mediante este proceso, se enviaban para su identificación o elucidación por medio de las técnicas de espectroscopía (RMN, IR, EM). Esta fase de identificación fue realizada fuera del laboratorio.

En la Fig. 12 se puede apreciar un diagrama de bloques que indica la secuencia del trabajo experimental antes descrito, tanto para el influente como para el efluente del RALLFA.

4.4 MÉTODOS QUÍMICOS DE IDENTIFICACIÓN

Para detectar azufre y cloro en los compuestos orgánicos obtenidos, fue necesario convertirlos en sustancias ionizables, tal que las pruebas de análisis cualitativo inorgánico pudieran ser aplicadas. La conversión puede ser realizada por diversos métodos, pero el mejor consistió en fundir los compuestos orgánicos con sodio metálico (prueba de Lasaigne). De esta forma, el sulfuro de sodio y el cloruro de sodio son formados y son fácilmente identificables. Así:



Fue necesario utilizar un exceso de sodio, ya que si están presentes el azufre y el nitrógeno, se formará tiocianato de sodio, difícil de identificar con el Azul de Prusia. Con el exceso de sodio, el tiocianato puede descomponerse



Si la solución alcalina filtrada es tratada con sulfato ferroso, se forma ferrocianuro de sodio. $\text{FeSO}_4 + 6\text{NaCN} \longrightarrow \text{Na}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + \text{Na}_2\text{SO}_4$ que, cuando se calentó esta solución alcalina de sal ferrosa, algunos iones férricos se produjeron por la acción del aire y, al adicionar ácido sulfúrico diluido, se disolvieron los hidróxidos férricos y ferrosos; Los ferrocianuros reaccionaron con la sal férrica y produjeron ferrocianuro férrico (Azul de Prusia):



Azufre. El azufre fue identificado específicamente acidificando 2 ml. de la solución fusionada con ácido acético diluido y, añadiendo unas gotas de solución de acetato de plomo. Un precipitado negro de sulfuro de plomo indicó la presencia de azufre.

Cloro. El cloro fue identificado adicionando nitrato de plata a la solución fusionada y acidificada, la cual precipitó cianuro de plata. La remoción del cianuro de hidrógeno después de la precipitación, se efectuó calentando la solución fusionada, acidificándola con ácido nítrico diluido y evaporando hasta reducirla a la mitad de su volumen original. Después se enfrió y se diluyó con un volumen igual de agua y, añadiendo unas gotas de nitrato de plata.

Un precipitado blanco o amarillo pálido y que se oscurece al exponerlo a la luz, indica la presencia de un halógeno. En particular si el precipitado es blanco y fácilmente soluble en solución amoniacal indica la presencia de cloro; si es amarillo pálido y se diluye con dificultad, el bromo está presente; y si es amarillo e insoluble, el yodo está presente.

En todos los casos en que se hizo esta prueba a los compuestos que se suponía tenían un halógeno, los resultados indicaron la presencia de cloro.

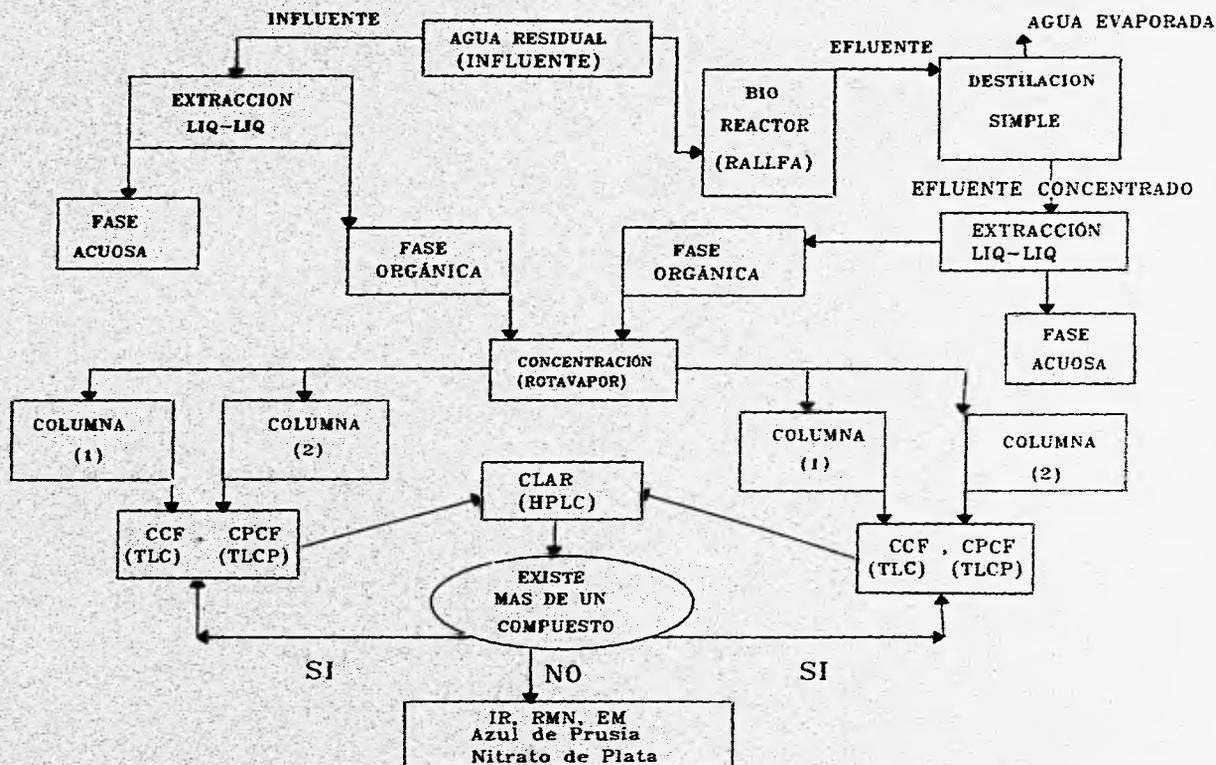


Fig.12 Diagrama de flujo del trabajo experimental de separación de compuestos disueltos en agua de campesúchil y su identificación o elucidación de sus estructuras químicas

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos y cómo se llegó a ellos

Compuesto 1 (compuestos alifáticos)

El espectro de infrarrojo de los compuestos alifáticos (aislados del influente del agua residual del cempasúchil) indican la ausencia de cualquier grupo funcional. Múltiples señales en el espectro de resonancia magnética nuclear fueron observada en la región de alta protección (región alifática). Una ausencia de señales fue detectada en la región desprotegida (región aromática del espectro). Los resultados espectrales de la fragmentación de masas también revelan la ausencia de grupos aromáticos en este compuesto. La fragmentación molecular de masas fue observada a 550 (M^+), lo cual ilustra que largas cadenas de compuestos alifáticos podrían estar presentes.

La fracción de hexano del agua residual del cempasúchil tratada (efluente), no contenía ningún tipo de compuestos alifáticos. Estos resultados pueden confirmar que los compuestos alifáticos son completamente degradados por las bacterias anaerobias presentes en el RALLFA y transformadas en energía, biogás y nuevas bacterias. La cantidad obtenida de este compuesto fue de 2500 mg en el influente; la cantidad en el efluente fue muy baja, (menos de 110 mg), para una muestra de 1L de agua a estudiar (tanto del influente como del efluente).

Compuesto 2 (4-cloroetil-1,3-bencenoditol)

En el espectro de infrarrojo de este compuesto se muestra dos grandes absorciones, entre 3000-3100 y 2850-2960 cm^{-1} . Esos resultados indican la presencia de amplias vibraciones -C-H. Fue separado, tanto del influente como del efluente del RALLFA.

En su espectro de resonancia magnética nuclear se observaron dos señales múltiples, de 6.7 a 7.5 ppm (región aromática); dos tripletes y dos señales simples de 2.0 a 2.3 y de 2.8 a 3.0 ppm, respectivamente. Este resultado elucida la presencia de grupos $-CH_2-CH_2-$ y dos señales magnéticas diferentes de grupos -SH- (Fig. 13).

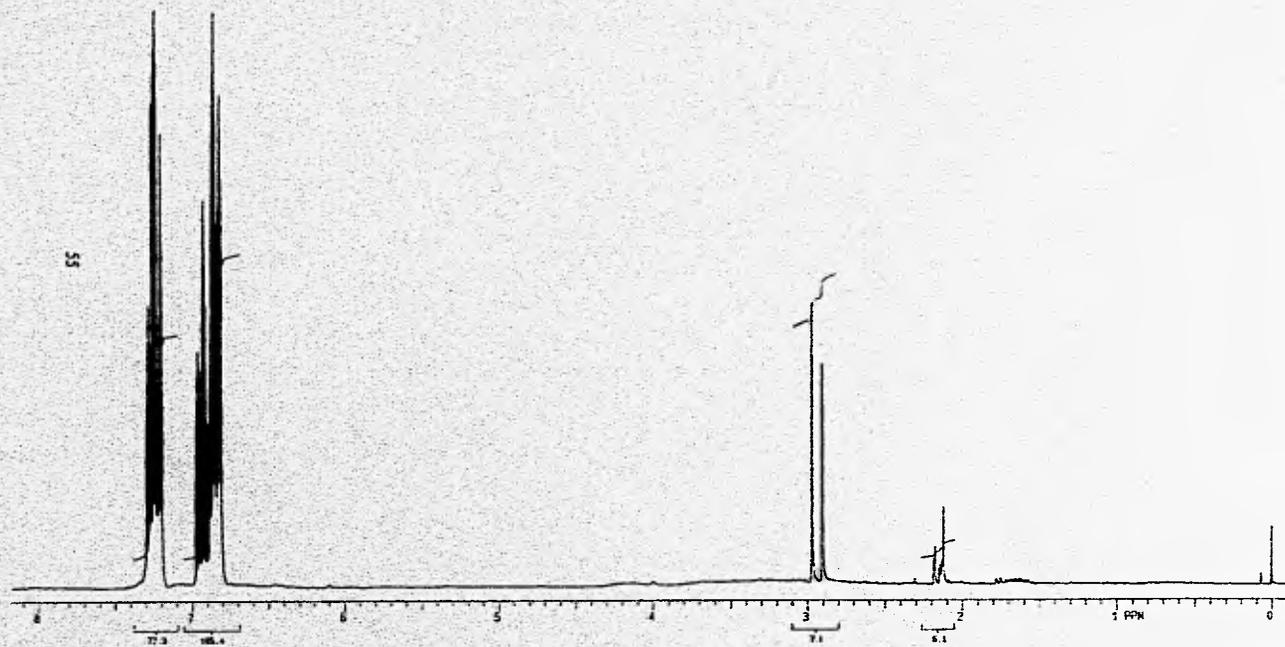


FIG.13 GRÁFICA OBTENIDA DE RMN DEL COMPUESTO AISLADO, TANTO EN EL INFLUENTE CON EL EFLUENTE E IDENTIFICADO COMO CLOROETIL BENCENODITIOLO.

Experimentos empleando azul de Prusia también confirman la presencia del elemento sulfuro. La solución de nitrato de plata (disuelta en ácido nítrico diluido) fue añadido al compuesto aislado, produciendo un precipitado incoloro. Esto demuestra la presencia de iones cloruro. La cantidad de compuesto separado fue de 65 mg en el influente y 60 mg en el efluente, para el mismo volumen de muestra estudiado.

Los resultados de la fragmentación de masas obtenido para este compuesto son m/e 28 (-CH₂-CH₂-), 75 (bencenoide), 89 (bencílico), 63 (-CH₂-CH₂Cl), 205 (M⁺). La fórmula molecular fue establecida como C₈H₉S₂Cl. Se encontró: C, 47.05%; H, 4.41%. Se requiere: C, 46.94%; H, 4.4%. Basados en los datos espectrales y de fragmentación de masa, el compuesto responsable del mal olor en el agua en estudio ha sido identificado como 4-cloroetil-1,3-bencenoditiol.

Compuesto 3 (4'-metoxi-5-hidroxi-7-acetilflavonona)

El espectro de infrarrojo de este compuesto, separado del influente y el efluente del agua residual del cempasúchil, muestra una fuerte absorción a 1670 cm⁻¹, que indica la presencia de -C=O (grupo carbonil). Las bandas de absorción a 3500-3600 y 1080 cm⁻¹ son debidas a grupos hidroxil. En el espectro de resonancia magnética nuclear, dos señales múltiples fueron observadas en la región aromática; una señal triple y una cuádruple aparecieron de 3.5 a 4.5 ppm. Esto indica la presencia de grupos -CH₂-CH con protones magnéticamente diferentes en el grupo -CH₂-. Dos señales simples fueron observadas también para -OCH₃, -COCH₃ de 3.40 a 3.45 ppm. Señales múltiples se observaron de 1.00 a 2.00 ppm, probablemente debidas al disolvente residual (hexano).

Los resultados de la fragmentación de masas obtenidos para el compuesto aislado son m/e 28 (CO), 76 (bencenoide), 89 (bencílico), 43 (COCH₃), 312 (M⁺). La fórmula molecular fue establecida como C₁₈H₁₆O₅. Se encontró: C, 68.89%; H, 4.85%. Se requiere: C, 69.22%, H, 5.12%. Basados en los datos de los espectros y en la fragmentación de masas, el compuesto ha sido identificado como 4'-metoxi-5-hidroxi-7-acetilflavonona.

La cantidad de compuesto obtenido fue de 10 mg en el influente y de 8 mg en el efluente, para el mismo volumen de muestra estudiado.

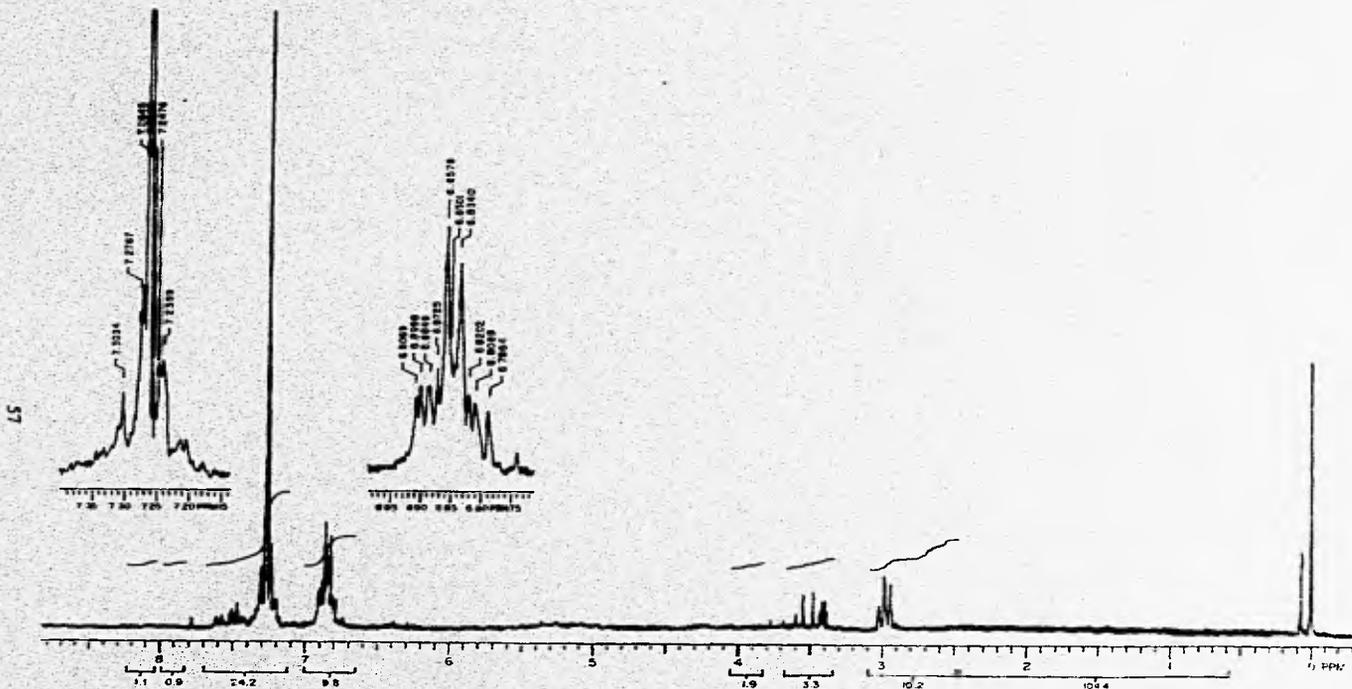


FIG.14 GRÁFICA OBTENIDA DE RMN DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO 4'-METOXI-5-IDROXI-7-ACETILFLAVONOMA

Compuesto 4 (isooctilftalato)

El espectro de infrarrojo de este compuesto muestra una fuerte absorción para el grupo -COOR (R=isooctil), que fue observada a 1745 cm^{-1} . Dos señales múltiples (de tipo simétrico) en el campo bajo indican la presencia de grupos aromáticos sustituidos simétricamente y las señales múltiples que aparecieron en el campo alto son para grupos alquil-alifáticos (Fig. 15). El espectro de la fragmentación de masas de este compuesto fue m/e 28 (CO), 148 (anhídrido ftálico), 390 (M^+).

La fórmula molecular fue confirmada como $C_{24}H_{38}O_4$. Se encontró: C, 73.51%; H, 9.59%. Se requiere: C, 73.84%; H, 9.74%. Sobre la base de los resultados espectrales se puede concluir que este compuesto puede ser isooctilftalato. La cantidad de compuesto obtenido fue de 110 mg en el influente y de 100 mg en el efluente, para el mismo volumen de muestra estudiado.

Compuesto 5 (4, 4' diclorobifenil)

El espectro de infrarrojo del compuesto 5, el cual es separado del influente así como del influente de agua residual de cempasúchil en un bio-reactor anaerobio, muestra una gran absorción a $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$. Esos resultados indican la presencia de amplias vibraciones -C-H (Fig. 16).

En el espectro de resonancia magnética nuclear, dos señales de tipo simétrico aparecieron en la región aromática ($7.35\text{-}7.60\text{ ppm}$); esto indica que protones de tipo simétrico están presentes en el anillo aromático (Fig. 17). Los resultados de la fragmentación de masas obtenidos para el diclorofenil son m/e 112.5 (clorobenceno), 223 (M^+). La fórmula molecular fue establecida como $C_{12}H_8Cl_2$, encontrando: C, 64.24%; H, 3.12%. Se requieren: C, 64.57%; H, 3.58%.

La solución de nitrato de plata (disuelta en ácido nítrico diluido) fue añadida al compuesto aislado, produciendo un precipitado incoloro. Esto verifica la presencia de iones cloruro. La cantidad de compuesto obtenido fue de 55 mg en el influente y de 50 mg en el efluente, para el mismo volumen de muestra estudiado. Basados en los datos espectrales y en la fragmentación de masas, el compuesto ha sido identificado como 4,4'-diclorobifenil.

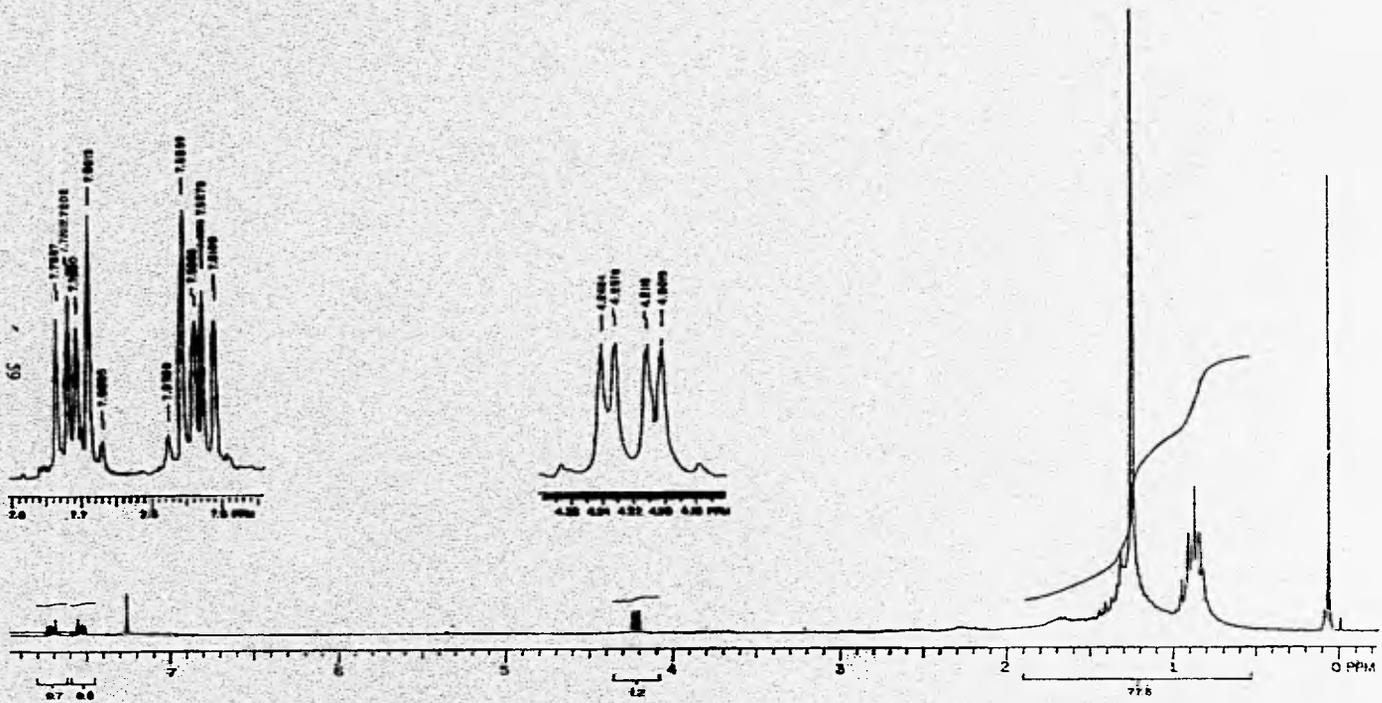
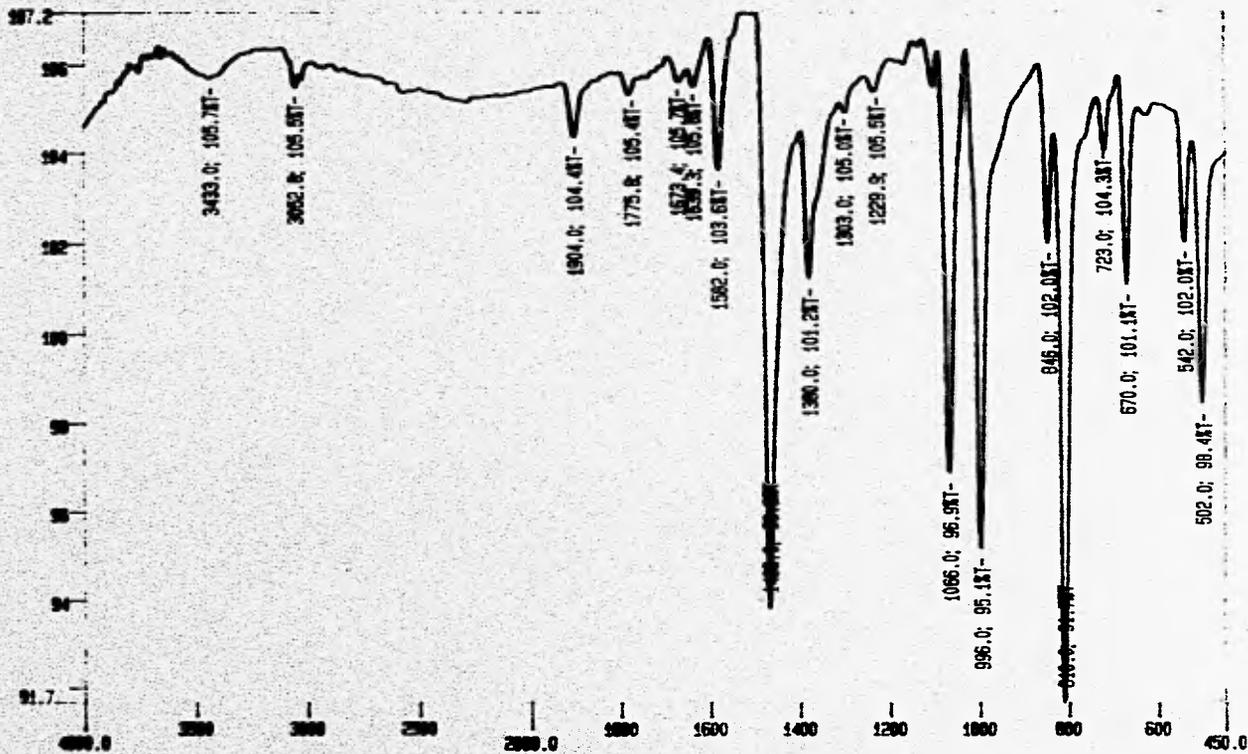


FIG.16 GRÁFICA DE IR DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO DICLOROBIFENIL



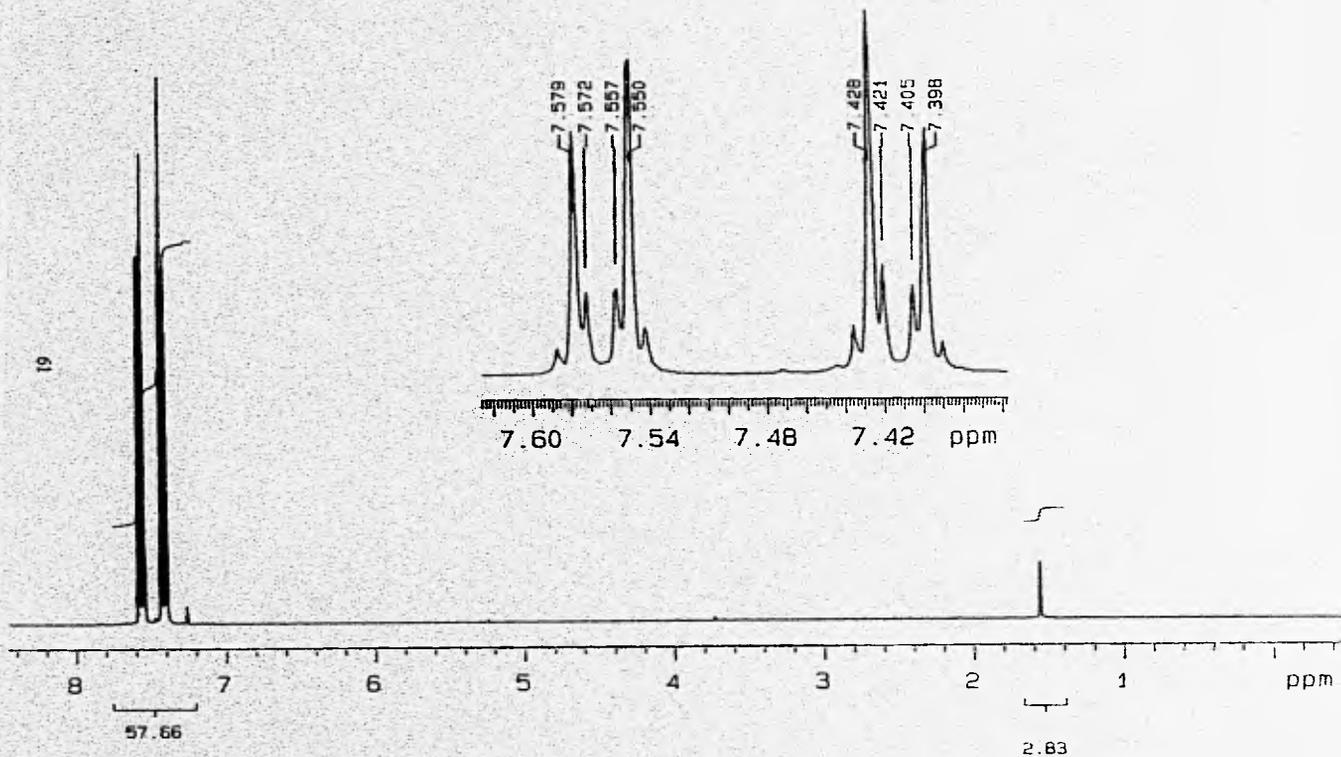


FIG.17 GRÁFICA DE RMN DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO DICLOROBIFENIL

Compuesto 6 (4-clorofenol)

El espectro de infrarrojo del compuesto 6, separado del influente y efluente del agua residual de cempasúchil en un bio-reactor anaerobio muestra una gran absorción a 3000-3600 cm^{-1} (Fig. 18). Estos resultados indican la presencia de amplias vibraciones -C-H y -OH

En el espectro de la resonancia magnética nuclear, dos tipos de señales simétricas aparecieron en la región aromática (6.7-7.2 ppm); esto indica que protones de tipo simétrico están presentes en el anillo aromático (Fig. 19). Los resultados de la fragmentación de masas obtenidos del clorofenol son m/e 93 (fenólico), 128 (M^+). La fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_6\text{H}_5\text{OCl}$. Se encontró C, 56.96%; H, 3.80%. Se requiere: C, 56.03%; H, 3.89% (Fig. 20).

La solución de nitrato de plata (disuelta en ácido nítrico diluido) fue añadida al compuesto aislado, produciendo un precipitado incoloro. Esto confirma la presencia de iones cloruro. La cantidad de compuesto obtenido fue de 75 mg para el influente y de 68 mg para el efluente, para el mismo volumen de muestra estudiado.

Basados en los datos de los espectros y de la fragmentación de masas, el compuesto fue identificado como 4-clorofenol.

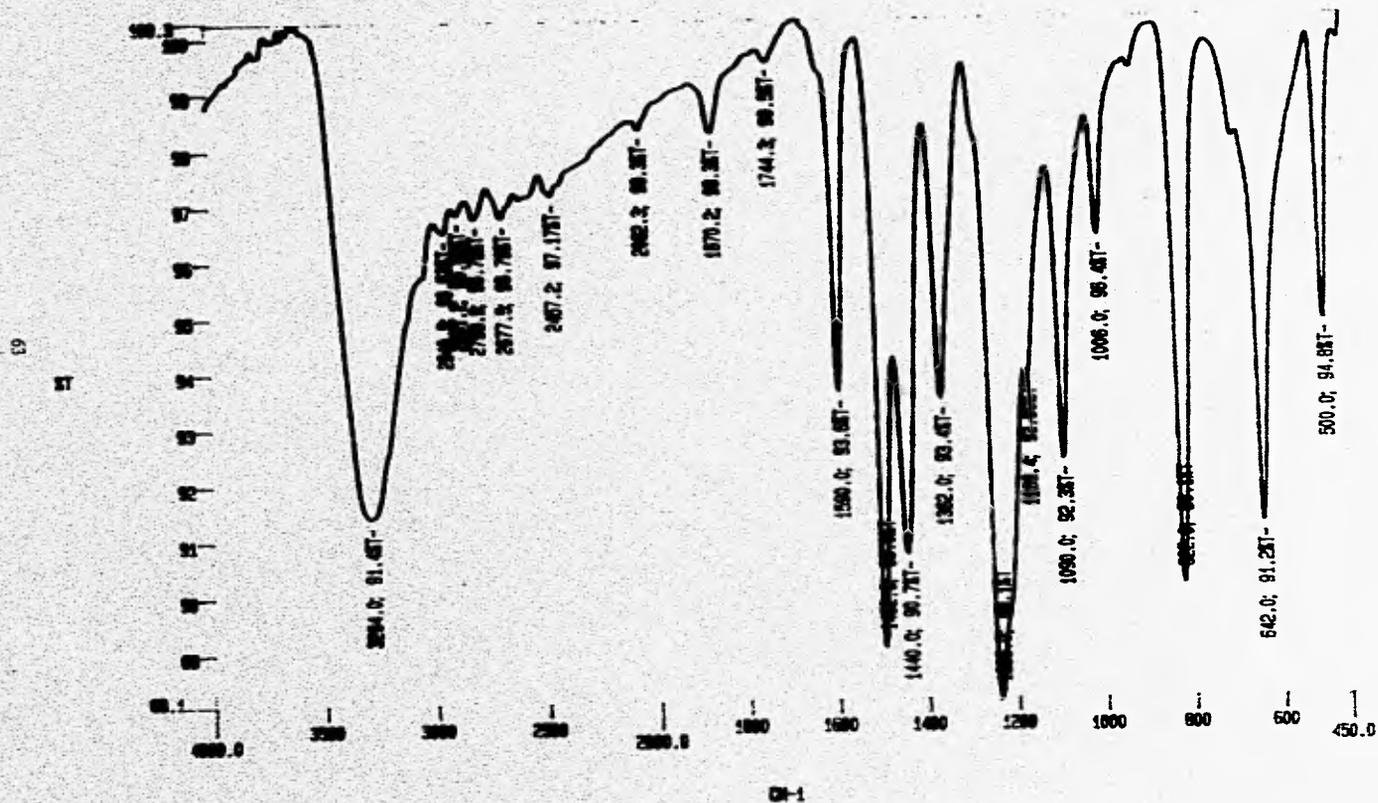
Compuesto 7 (2,4- diclorofenol)

El espectro de infrarrojo del compuesto 7, que fue separado del influente y del efluente del agua residual de cempasúchil en un bio-reactor anaerobio de laboratorio, muestra una gran absorción a 3000-3600 cm^{-1} . Estos resultados indican la presencia de amplias vibraciones -C-H y -OH (Fig. 21).

En el espectro de resonancia magnética nuclear, señales múltiples aparecieron de 6.9 a 7.4 ppm (dos señales simples de 6.93 a 6.97; dos dobletes de 7.10 a 7.18; un doblete de 7.3 a 7.35) (Fig. 22). Los resultados de la fragmentación de masas obtenidos para el diclorofenol son m/e 75 (bencenolde), 163 (M^+). La fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$. Se encontró: C, 43.89%; H, 2.15%. Se requiere: C, 44.17, H, 2.45 (Fig. 23).

La solución de nitrato de plata (disuelta en ácido nítrico diluido) fue añadido al compuesto aislado, el cual fue separado del agua residual de cempasúchil, produciéndose un precipitado incoloro. Esto demuestra la presencia de iones cloruro.

FIG.18 GRÁFICA DE IR DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO CLOROFENOL



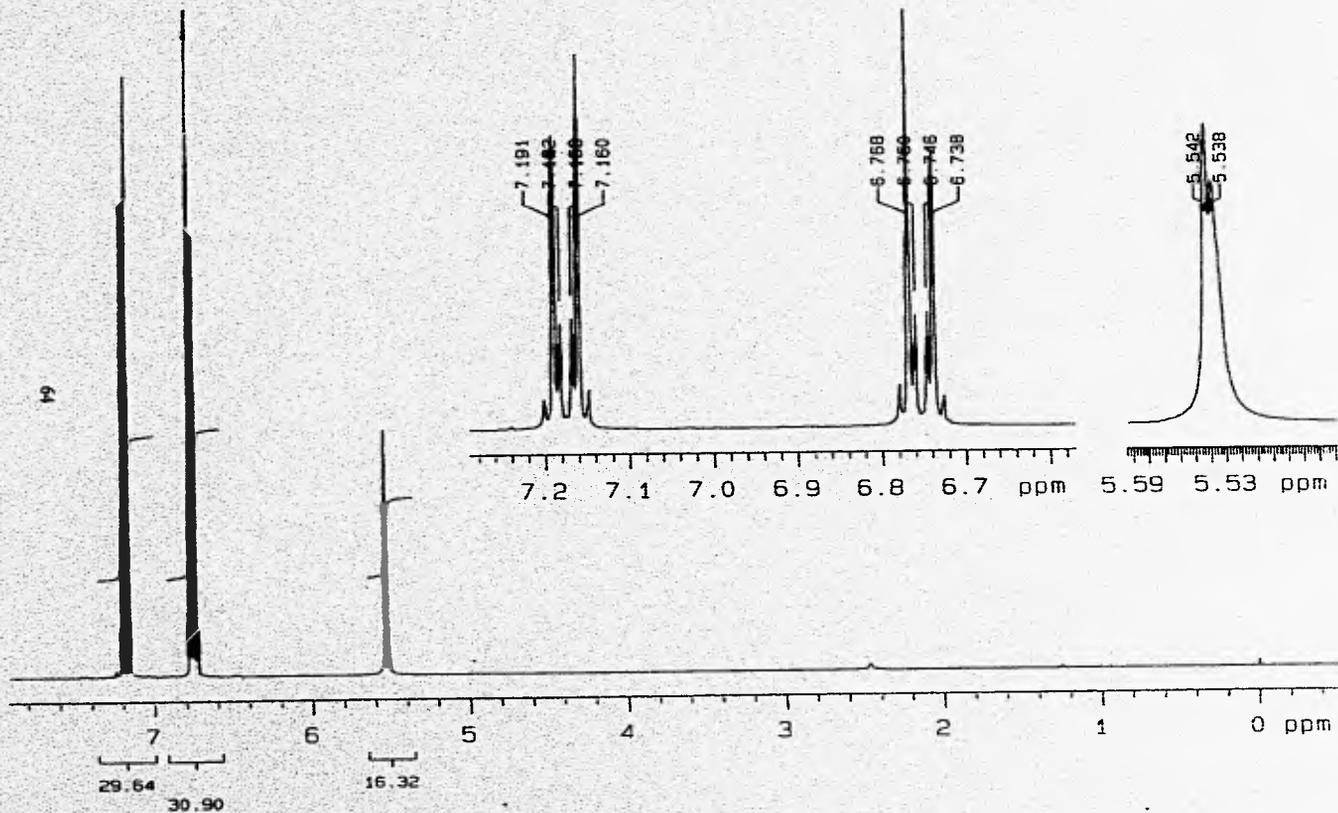


FIG.19 GRÁFICA DE RMN DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO CLOROFENOL

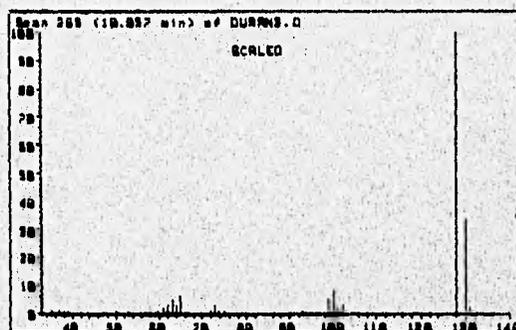
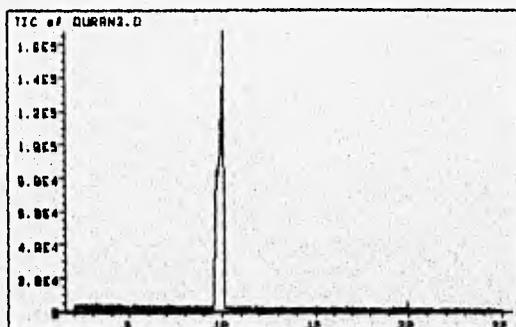
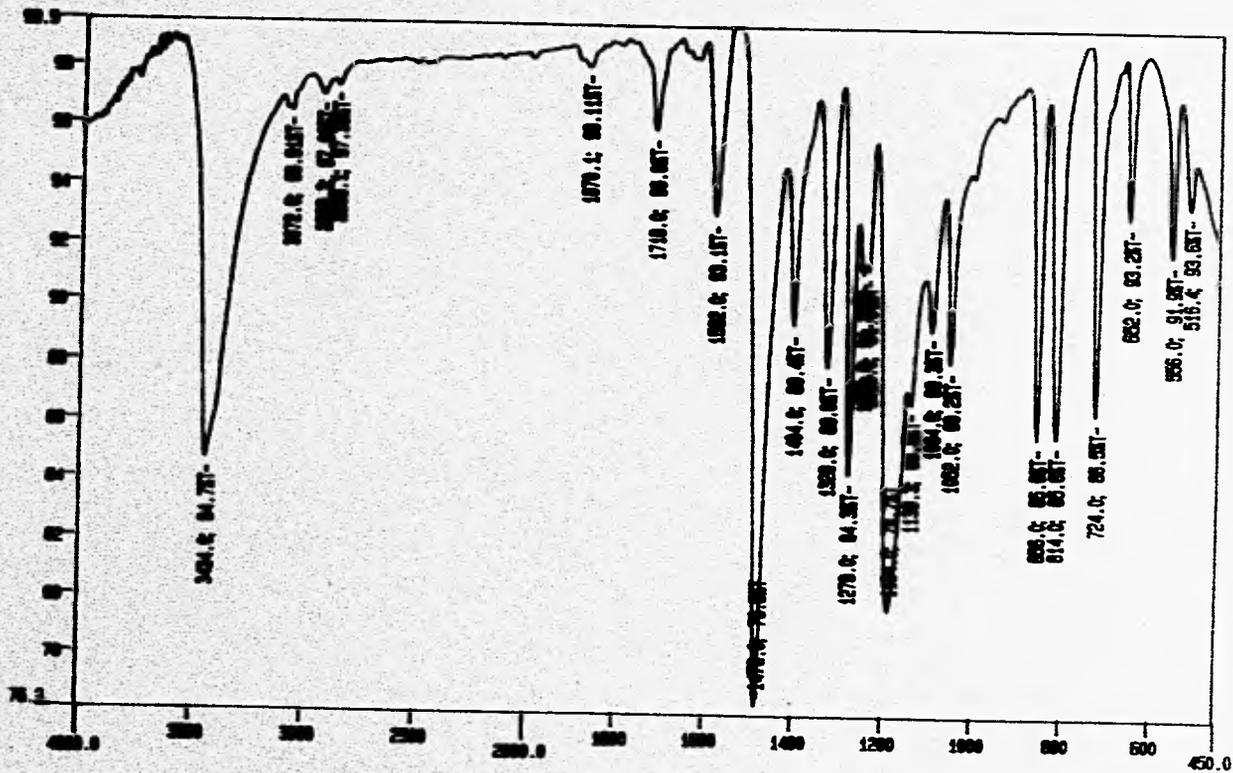


FIG. 20 GRÁFICA DE EM DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO CLOROFENOL.

FIG. 21 GRÁFICA DE IR DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO DICLOROFENOL



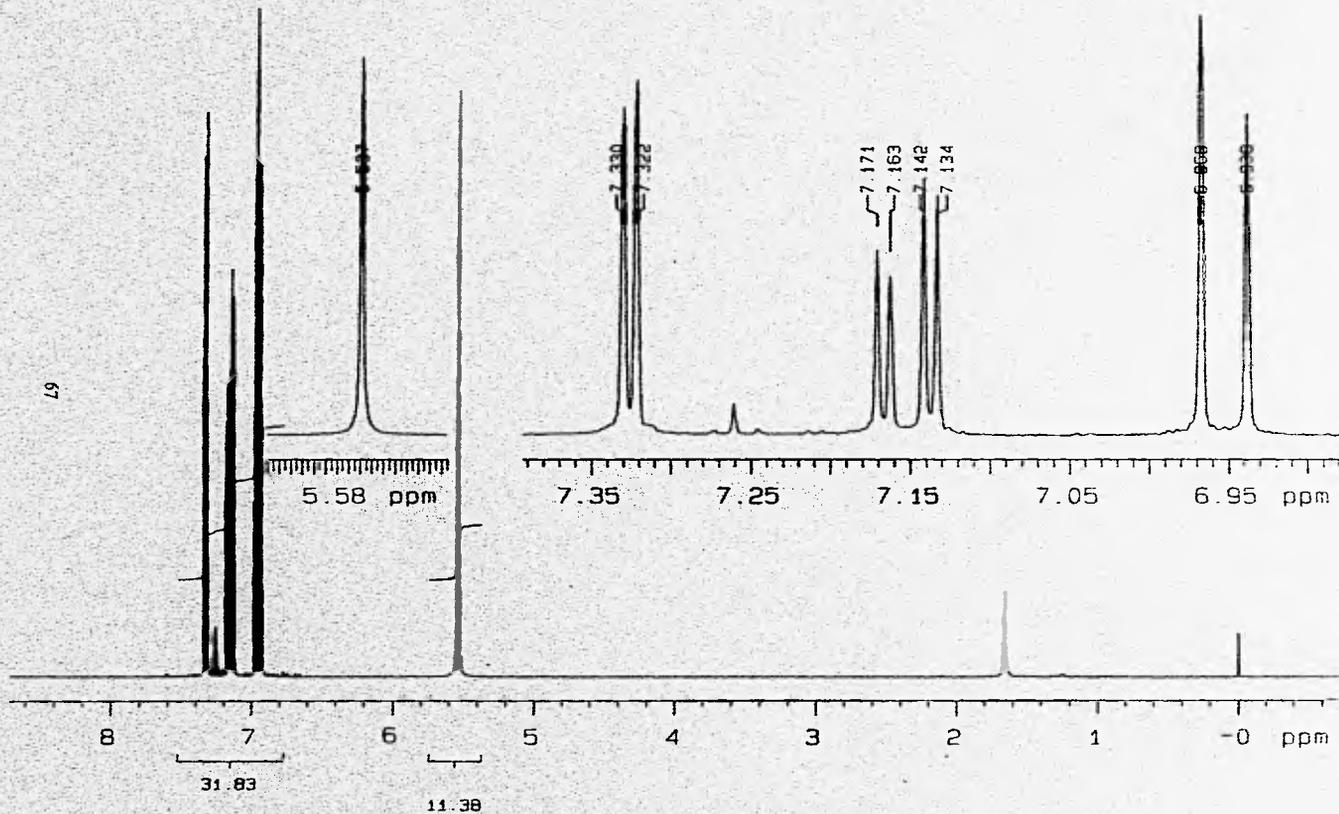


FIG. 22 GRÁFICA DE RMN DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y AFLUENTE DE UN RALLFA C... AIA
 AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO DICLOROFENOL

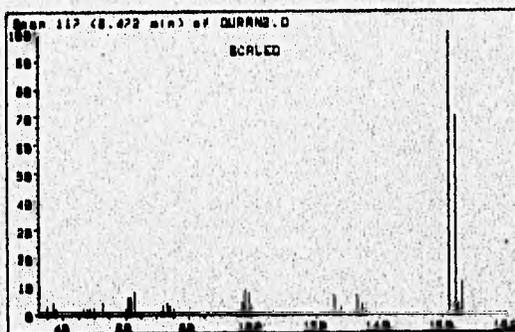
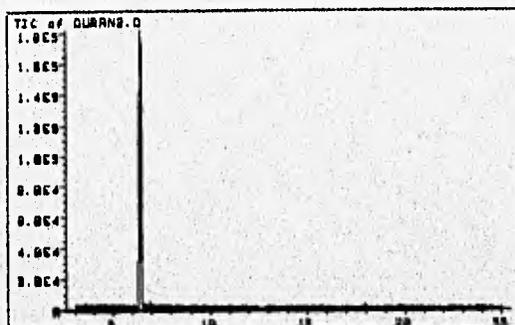
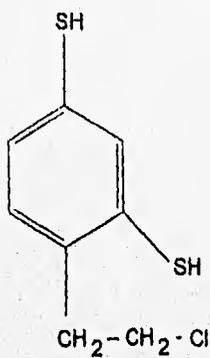


FIG. 23 GRÁFICA DE EM DEL COMPUESTO AISLADO DEL INFLUENTE Y EFLUENTE DE UN RALLFA QUE TRATA AGUA RESIDUAL DE CEMPASÚCHIL Y QUE FUE IDENTIFICADO COMO DICLOROFENOL

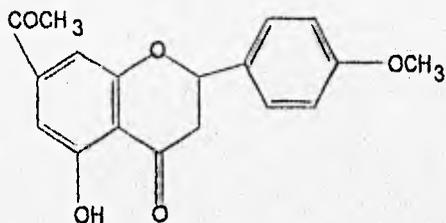
La cantidad de compuesto obtenido fue de 45 mg en el influente y de 40 mg en el efluente, para el mismo volumen de muestra estudiado.

Basados en los datos de los espectros y la fragmentación de masas, el compuesto ha sido identificado como 2,4-diclorofenol.

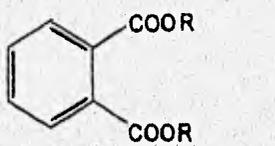
Las fórmulas estructurales de los compuestos aislados se muestran en la Fig.24



(1)

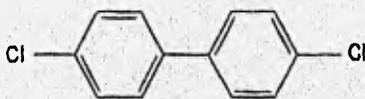


(2)



R= ISO-OCTIL

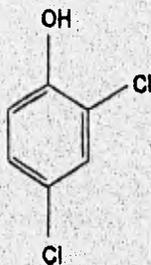
(3)



(4)



(5)



(6)

Fig.24 Fórmulas estructurales de (1) 4-cloroetil-1,3-bencenoditiol, (2) 4'-metoxi-5-hidroxi-7-acetilflavonona (3) iso-octilfialato, (4) 4,4'-diclorobifenil, (5) 4-clorofenol, (6) 2,4-diclorofenol

Capítulo 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El objetivo de la presente investigación fue separar las moléculas orgánicas disueltas en el agua residual del campasúchil presentes, tanto en el influente como en el efluente de un bio-reactor anaerobio, utilizando técnicas cromatográficas y caracterizando dichas moléculas por métodos espectroscópicos para identificar qué compuestos sí fueron degradados en el biorreactor.

Por ello, puede concluirse de este trabajo que los compuestos encontrados en un volumen de 1L tanto para el influente como para el efluente fueron:

COMPUESTO	INFLUENTE	EFLUENTE	% DE DEGRADACION
Alifáticos de largas cadenas	2500 mg	110 mg	95.6
4-cloroetil-1,3-bencenoditiol	65 mg	60 mg	7.7
4'-metoxi-5-hidroxi-7-acetilflavonona	10 mg	8 mg	20
Iso-octilfitalato	110 mg	100 mg	9.09
4,4'-diclorobifenil	55 mg	50 mg	9.09
4-clorofenol	75 mg	68 mg	9.33
2,4-diclorofenol	45 mg	40 mg	11.11

1.- Se puede observar que en el influente existen compuestos alifáticos de largas cadenas así como compuestos aromáticos muy variados. De ellos, en el efluente se observa que los compuestos aromáticos están aun presentes, o sea, que no fueron degradados por las biocomunidades anaerobias. Los compuestos alifáticos están presentes en muy bajas concentraciones en el efluente, lo que indica que éstos sí fueron convertidos por los organismos anaerobios en energía, biomasa y biogás.

2.- Los estudios espectrales mostraron que los grupos mercapto/sulfuros contenidos en las moléculas orgánicas aromáticas están presentes en el agua residual y son los responsables de los malos olores.

Las recomendaciones que se sugieren para el estudio de la degradación de los compuestos aromáticos presentes en el agua son:

1. Modificar las técnicas de tratamiento biológico para promover la degradación de estos anillos.
2. Probar los tratamientos químicos menos costosos que puedan estabilizarlos
3. Probar técnicas electroquímicas
4. Probar técnicas fotocatalíticas

BIBLIOGRAFIA

- Abbot D., Andrews R.S.; 1983. "Introducción a la cromatografía". Ed. Alhambra, Madrid, España. pp. 1-6, 10-13, 16-20, 59-60, 61-64
- Anónimo; 1990. "Efluentes deshidratadoras, reporte final". Laboratorios Bioquímex S.A. de C.V. México D.F., México, pp. 4-6
- Arvizu J.L.; 1981. "La digestión "anaeróbica" de residuos orgánicos". Trabajo Monográfico de actualización. Facultad de Química, UNAM, México D.F., México, pp. 1-2, 15-16
- Brown C.M., Campbell I., Priest, F.G.; 1989. "Introducción a la biotecnología". Ed. Acirbia S.A., Barcelona, España, pag.143
- Casarrubias M., Hernández J.G.; 1996. "Tratamiento de aguas residuales derivadas del ensilado y prensado del cempasúchil (*Tagetes erecta*) en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA)". Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM, México D.F., México, pag.45
- Cueto O.; 1994. "Experiencias en la industrialización de la "flor" de cempasúchil (*Tagetes erecta*)". Tesis profesional, ESQIE-IPN, México D.F., México, pag. 9
- Devore G, Muñoz E.; 1984. "Química Orgánica". Publicaciones Cultural S.A. de C.V., México D.F., México, pag. 95
- Durán de Bazúa C., Saval de Hach S., Lucero Sánchez H., 1991. "Degradación aerobia de aguas residuales que contienen metilaminas y dimetilformamida". Vol. 2, Serie: Química Ambiental del Agua, PIQAYQA. Facultad de Química, UNAM, México D.F., México.
- Durán de Bazúa C., Pandiyan T., Granados Hernández E., López Andrade X., 1995. "Caracterización espectroscópica de compuestos orgánicos odoríferos separados del agua de proceso del cempasúchil (*Tagetes erecta*)". Presentado en III Simposio Centroamericano y del Caribe de Química Analítica, Ambiental y sanitaria. San José, Costa Rica, C.A.

- Granados Hernández, E.; López Andrade X.; Pandiyan T.; Durán de Bazúa C.; 1995. Odorous compounds separated from cempasúchil (*Tagetes erecta*) processing water spectroscopic methodologies. En memorias del Segundo Minisimposio Internacional sobre remoción de Contaminantes de Aguas y Suelos (Proceedings of Second International Mini-Symposium on Removal of Contaminants from Water and Soil, 2: 159-167
- Guerrero R. A.; 1980. "Factores que influyen en la cuantificación de *Tagetes erecta* (flor de cempasúchil)". Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM, México D.F., México, pp. 12-14
- Jiménez Ambríz R.M., Martínez Garza M.A.; 1995. "Instalación y arranque de un reactor anaerobio en un tren anaerobio-aerobio de una planta piloto de tratamiento de vinazas. Tesis profesional. Facultad de Química UNAM. México D.F., México, pag. 27
- Morrison R.T., Boyd R.N.; 1976. "Química Orgánica". Editorial Fondo Educativo Interamericano S.A., México D.F., México, pp. 424, 434
- Omen G.; 1987. "Environmental Biotechnology". Basic Life Sciences, V. 45. pp. xi, 61, 143
- Rojo A.L.; 1989. "*Dyssodia* y *Tagetes*, su evolución y filogenia dentro de la tribu *Tageteae* (*Asteraceae*)". Ensayo Bibliográfico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México D.F., México, pp. 1, 11-12, 17-19, 22-23, 36, 43-44
- SARH; 1989. Dirección General de Estadística, México D.F., México.
- SARH; 1993. Dirección General de Información Agropecuaria, Forestal y de Fauna Silvestre, México D.F., México.
- Silverstein M., Bassler G. C.; 1980. "Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos", Ed. Diana, 1ª edición, México, D.F., México, pp. 85-86, 171
- Solomons T.W.G.; 1988. "Química Orgánica". Ed. Limusa, México, D.F., México, pp. 531-532
- Winkler, M. A.; 1986. "Tratamiento biológico de aguas de desecho". Ed. Limusa, México D.F., México, pag. 15

APÉNDICE

Identificación de compuestos

Compuesto 1

CAROTENOIDES

RESULTADOS

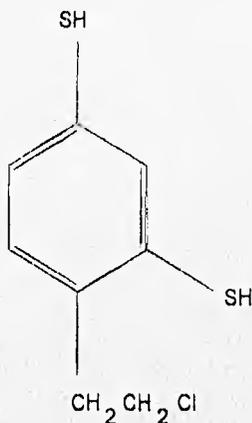
IR= Ausencia de cualquier grupo funcional

RMN= señales múltiples fueron observadas en la región del campo alto (región alifática) y ausencia de señales en la región del campo bajo (región aromática)

EM= Ausencia de grupos aromáticos
Cadenas largas de compuestos alifáticos

550 (M⁺)

Compuesto 2



4-CLOROETIL-1,3-BENCENODITOL

RESULTADOS

IR= 3000-3100 y 2850-2960

-C-H

RMN = 6.7-7.5 ppm (2 señales múltiples)

2.0-2.3 ppm (dos triples señales)- CH₂ - CH₂

2.8-3.0 ppm (dos señales simples) -SH

EM (m/e) = 28 (- CH₂ - CH₂)

75 (bencenoide)

89 (bencilico)

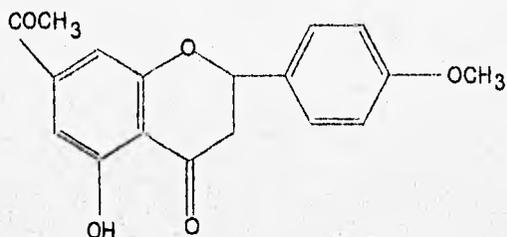
63 (-CH₂ - CH₂ - Cl)

205 (M⁺)

Cl⁻ = Prueba del nitrato de plata para la identificación de iones cloruro

S⁻ = Prueba del azul de Prusia para la identificación de iones sulfuro

Compuesto 3



4'-metoxi-5-hidroxi-7-acetilflavonona

RESULTADOS

IR= 1670 cm^{-1} (- C = O)

$3500-3600 \text{ cm}^{-1}$ (OH -)

RMN= *dos señales múltiples (región aromática)*

una señal triple 3.5

una señal cuádruple 4.5

dos señales simples - OCH₃

- COCH₃

EM (m/e) = 28 (CO)

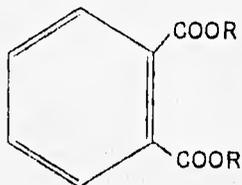
76 (bencenoide)

89 (bencilico)

43 (COCH₃)

312 (M⁺)

Compuesto 4



R= ISO-OCTIL

ISO-OCTILFTALATO

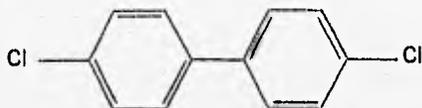
RESULTADOS

IR= Absorción observada en 1745 cm^{-1}
COOR (ISO-OCTIL)

RMN= Dos señales múltiples (de tipo simétrico) en el campo bajo indican la presencia de un grupo aromático sustituido simétricamente.
señales múltiples en el campo alto

EM(m/e)= 28 (CO)
148 (anhídrido ftálico)
390 (M⁺)

Compuesto 5



4,4'-DICLOROBIFENIL

RESULTADOS

IR= Absorción observada a $3000-3100\text{ cm}^{-1}$

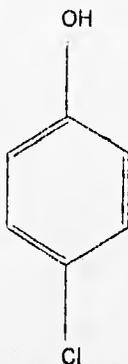
RMN= 7.35-7.60 ppm (dos señales simétricas)

EM (m/e) = 112.5 (clorobenceno)

223 (M^+)

Cl^- = Prueba del nitrato de plata para la identificación de iones cloruro

Compuesto 6



4-CLOROFENOL

RESULTADOS

IR=3000-3600 cm^{-1}

-C-H y OH

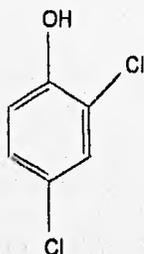
RMN= 6.7-7.2 ppm (2 señales simétricas)

EM(m/e)= 93(fenólico)

128 (M^+)

Cl^- = Prueba del nitrato de plata para
la identificación de iones cloruro

Compuesto 7



2,4-DICLOROFENOL

RESULTADOS

IR= 3000-3600 cm^{-1}
-C-H y OH

RMN=6.9-7.4 ppm (señales múltiples)
6.93-6.97 ppm (dos señales simples)
7.10-7.18 ppm (dos dobletes)
7.3-7.35 ppm (un doblete)

EM (m/e)= 75(bencenoide)
163 (M^+)

Cl^- = Prueba de nitrato de plata para la identificación de iones cloruro