

620 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

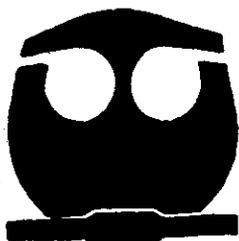
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

"IMPLANTACION Y COMPARACION DE
DESEMPEÑO DE METODOS NORMALIZADOS DE
DETERMINACION DE FENOLES EN AGUAS
RESIDUALES EN EL LABORATORIO DE
BACTERIOLOGIA Y FISICOQUIMICA DEL DDF"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C A
P R E S E N T A :
MARIA DE LA PAZ ORTA PEREZ



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268322



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Ma. Antonia Dosal Gómez
Vocal	Prof. Pedro Villanueva González
Secretario	Prof. Alain Queré Thorent
1er. Suplente	Prof. José Alejandro Baeza Reyes
2o. Suplente	Prof. José de Jesús García Valdés

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio de Bacteriología y Físicoquímica del DDF

SUSTENTANTE:

Maria de la Paz Orta Pérez



ASESOR DEL TEMA:

Dr. Alain Queré Thorent



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alain Queré, por todo el apoyo, la paciencia y la excelente dirección en el transcurso de esta investigación. Así también por la minuciosa revisión de este trabajo.

Al Dr. José Luis Moya, por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo de investigación, dentro de las instalaciones del Laboratorio de Bacteriología y Físicoquímica del DDF.

A todo el personal del laboratorio, por su amistad y apoyo.

Al Dr. Bob Johnson y a la Secretaría de Atención de Alumnos, por haberme otorgado beca alimenticia durante varios semestres.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, al Dr. Jesús Guzmán, al Dr. Federico Del Río Portilla, al Dr. Luis Miguel Trejo Candelas, al Dr. Anibal Bascuñan Blaset y a mis compañeros: Concepción Escartín, Edgardo Viguera, Gerardo Barón y Ricardo Figueroa, por haberme apoyado para que me otorgaran el Premio *Fernando Estrada para alumnos de alto desempeño académico y bajos recursos (1995)*, así también agradezco al comité organizador; ya que dicho premio fue un gran aliciente al final de mis estudios

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química.

A pueblo de México, que de una u otra forma aporta recursos para que muchos de nosotros podamos realizar estudios profesionales.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre.

A mi madre, por todo su apoyo y comprensión.

A mis hermanos: Miguel, Juanita, Leopoldo, Álvaro, Maxy, Gabriela, Antonia y Héctor Manuel.

A mis sobrinos y sobrinas.

A mis amigos:

María de la Luz Medina, Alicia Trejo, Concepción Escartín, Edgardo Viguera, Gerardo Barón, Jorge Luis López, Odette Hdez., Marcos Flores, Victorino Ortega, Magallí Martínez, Ekaterine Martínez B., Ana María Álvarez, Alma Alexandra García, Marco Antonio Vera, David L., Ana Lilia, José Antonio, Blanca.

A Ricardo Figueroa González, por su apoyo; cariño y comprensión.

A la generación de Químicos 1992.

Al Grupo 15 Sadapi (Generación 1996).

A mis amigos del grupo Camelot.

A mis compañeros del Centro para el Desarrollo del Potencial Humano.

A Leonardo Stemberg y a Napoleón Hill.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
ANTECEDENTES	4
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	38
ANÁLISIS DE RESULTADOS	80
CONCLUSIONES	88
ANEXO I. Titulación de las disoluciones de tiosulfato de sodio y fenol	90
ANEXO II. Espectros de absorción	93
ANEXO III. Curvas de calibración	95
ANEXO IV. Resultados de los diferentes estudios	100
ANEXO V. Cálculos de precisión	112
BIBLIOGRAFIA	116

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los fenoles son compuestos hidroxiderivados del benceno, que son tóxicos y pueden aparecer tanto en aguas residuales, domésticas e industriales, como en aguas naturales y en suministros de agua potable, a las que confieren mal olor y sabor después de un tratamiento con cloro. Por este motivo es necesario tener control de su concentración en estos tipos de aguas.

La determinación de compuestos fenólicos juega un papel muy importante en la medición de la calidad del agua. El nivel de fenoles es un indicador de la presencia de la contaminación procedente de fuentes industriales.

Conforme se ha incrementado el interés por el abatimiento de la contaminación y ha surgido la necesidad de contar con métodos confiables para la determinación de fenoles en aguas naturales y residuales, se han desarrollado varios métodos. Debido a las ventajas que presentan algunos de ellos, han sido elegidos para ser normalizados, como es el caso de los métodos espectrofotométricos de la 4-aminoantipirina y del MBTH, entre otros.

El método espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina sirve para determinar el llamado "índice de fenol", que es el porcentaje de compuestos fenólicos detectados por el método, en ciertas condiciones.

Este método no permite distinguir entre los diversos tipos de fenoles y es útil para determinar únicamente el valor mínimo de compuestos fenólicos *destilables* presentes en la muestra analizada; sin embargo, esto es suficiente para la caracterización de aguas en cuanto a este tipo de contaminantes. Por esto y porque presenta varias ventajas, tales como la facilidad, rapidez y confiabilidad de los resultados, el bajo costo y aplicabilidad en un amplio intervalo de concentraciones, ha sido utilizado ampliamente durante varias décadas en los análisis de aguas, residuos sólidos y lodos.

Aunque diversos organismos internacionales realizan una validación de sus métodos antes de publicarlos, el laboratorio de prueba tiene la responsabilidad de probar la validez de los mismos para aplicaciones específicas y la propia habilidad del personal técnico para ponerlas en la práctica; esto último es muy importante, ya que un método validado no es suficiente para la producción de resultados confiables, la mayoría de los métodos requiere de un grado de habilidad de parte de los analistas.

En nuestro país, los laboratorios de prueba deben tomar como referencia principal la norma mexicana NOM-AA-50, que proporciona el procedimiento para la determinación de fenoles en aguas de origen residual y natural. Esta norma recomienda el método de la 4-aminoantipirina e indica que, en las condiciones especificadas, éste es aplicable en un intervalo de concentraciones de 0.001 a 1 mg/L. Sin embargo, dicho intervalo es demasiado estrecho para dictaminar si una

muestra de agua residual cumple con el límite máximo permisible, que según la NOM-CCA-031-ECOL-1993 es de 5 mg/L como promedio diario y 10 mg/L como valor instantáneo. Este documento recomienda la utilización de una extracción con cloroformo para la determinación; esto es recomendable cuando se tienen niveles de concentración de fenoles menores a 100 ppb, pero no para concentraciones mayores, que se encuentran en aguas residuales.

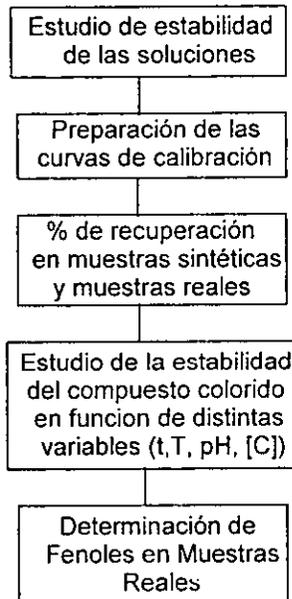
Por todo ello resulta necesario realizar una revisión de dicha norma, ya que no se puede aplicar estrictamente; de ahí que surge la necesidad de realizar un estudio del método y modificarlo con la finalidad de que también sea aplicable en aguas residuales.

Por otra parte, cada vez se requieren métodos que sean capaces de detectar mayor cantidad de contaminantes, como es el caso de los compuestos fenólicos. El método del MBTH, propuesto por la EPA (Environmental Protection Agency), a comparación del método de la 4-AAP permite la determinación de un número mayor de especies fenólicas. Esto se debe a que el MBTH reacciona con los fenoles no sólo en la posición *para*, sino también en la *orto* si es que la primera se encuentra ocupada. Con éste método se pretende tener una forma adecuada para la determinación de una variedad mayor de fenoles en muestras residuales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Establecer, en el Laboratorio de Bacteriología y Físicoquímica del DDF, los métodos normalizados de la 4-aminoantipirina y del MBTH para la determinación de fenoles en aguas residuales, de acuerdo al siguiente diagrama:



2. Comparar los métodos con base en un estudio estadístico de los resultados obtenidos y después del tratamiento de muestras reales.
3. Decidir cuál de los dos métodos es el más adecuado para el análisis de rutina del laboratorio de acuerdo a las exigencias del mismo.
4. Realizar una revisión de la norma mexicana NOM-AA-50 y ajustar su contenido a las necesidades del laboratorio.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 Fenoles

2.1.1 Generalidades

La denominación "fenol" se utiliza en forma específica para el compuesto monohidroxibenceno y, en forma genérica, para cualquier sustancia que contenga en su estructura uno o más grupos hidroxilo unidos al anillo aromático.^{26,63}

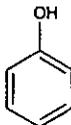


Figura 1. Fenol

El monohidroxibenceno se conoce también como ácido carbólico, oxibenceno, ácido fénico, hidrato de fenilo, hidróxido de fenilo, ácido fenílico, alcohol fenílico.^{22,26,58} En 1834 fue aislado del alquitrán de carbón por Runge, y hasta la 1a. Guerra Mundial, ésta era su única fuente de obtención. Posteriormente se desarrollaron varios procesos de síntesis, y actualmente un 99% de este producto se obtiene por síntesis orgánica.^{26,63}

La mayor producción de fenol se obtiene por el proceso del cumeno-hidroperóxido y el proceso de tolueno-ácido benzoico. Se conocen otros métodos como la cloración, oxiclорación, sulfonación del benceno, y la oxidación-dehidrogenación del ciclohexano; el proceso más importante es el primero, ya que además de que se produce el fenol, se obtiene acetona como producto secundario.^{22,26,27}

A los monometil derivados del fenol, o monohidroxiderivados del tolueno, se les conoce como cresoles. Existen tres isómeros del cresol: *orto*-cresol(2-metilfenol), *meta*-cresol(3-metilfenol) y *para*-cresol (4-metilfenol). Los cresoles se extraen del alquitrán de carbón y se encuentran en fracciones de petróleo.

Los dimetilderivados del fenol, o monohidroxi derivados del xileno, se conocen como xilenoles; existen seis isómeros, su principal fuente de obtención es también el alquitrán de carbón y el petróleo.

Existen tres dihidroxibencenos: el pirocatecol (1,2-dihidroxibenceno), que se encuentra en muchas plantas; el resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y la hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno). Los tres trihidroxibencenos que se conocen son: el pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno), la hidroxiquinona (1,2,4-trihidroxibenceno) y el fluoroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno).⁶³

El grupo hidroxilo de los fenoles puede unirse a anillos aromáticos condensados; como ejemplos de estos compuestos tenemos a los hidronaftalenos o naftoles.⁶³

Se han encontrado cantidades de fenol en algunos vegetales, como en las hojas de tabaco y en las ramas de pino. Existen otros fenoles de origen natural como carvacrol, timol, vainillina, tirosina.²⁷

2.1.2 Propiedades de los fenoles

El fenol se presenta como cristales blancos traslúcidos a temperatura ambiente, su color se torna rosa o rojo cuando contiene impurezas o cuando se expone al calor o a la luz; tiene un olor característico dulce y alquitranado, y un sabor quemante.^{22,26,58}

Tabla 1. Propiedades físicas del fenol

Propiedad física	Valor
Peso molecular	94.11 g/mol ^{45,63}
Punto de fusión	40.90 °C ⁶³
Punto de ebullición	181.75 °C a 1 ^a tm ^{26,63}
Densidad	1.072 g/cm ³ a 20°C ^{22,26}
Índice de refracción	1.5418 ⁴⁵
Presión de vapor a 25°C	46.84 MPa (0.46 atm) ⁴⁵
Solubilidad a 25°C	9.3 g en 100 g de H ₂ O ⁶³ 8.2 g en 100 g de benceno ⁴⁵
pKa a 25°C	9.88 ⁶³
Calor de fusión	25.37 kcal/mol ⁶³
Calor de combustión	732 kcal/mol ⁶³
Límite de explosión	1.7 - 8.6% ²²
Temperatura de autoignición	715°C ²²
Viscosidad, mPa·s(=cP)	
a 50°C	3.49 ²⁶
a 70°C	2.03 ²⁶
a 90°C	1.26 ²⁶

Tiene una solubilidad limitada en agua entre 0 y 65°C, por encima de 65.3°C es soluble en todas proporciones.²⁶ También es soluble en alcohol, benceno, éter, cloroformo, acetato de etilo, tolueno, glicerol y aceite de oliva; se disocia parcialmente en ácidos orgánicos.^{22,26,45} Su solubilidad disminuye con la presencia de sustituyentes alquilo; los xilenoles son muy poco solubles en agua y los propilfenoles son prácticamente insolubles.⁶³

Los fenoles de peso molecular más bajo son líquidos, o sólidos de punto de fusión bajo y puntos de ebullición relativamente elevados. Las propiedades de los fenoles son semejantes en muchos aspectos a las de los alcoholes. Así, los fenoles de bajo peso molecular son por lo general un tanto hidrosolubles y tienen

alto punto de ebullición debido a puentes de hidrógeno intermoleculares. Sin embargo, la propiedad más importante de los fenoles es su acidez. Los fenoles son ácidos débiles que pueden disociarse en soluciones alcalinas para formar el anión fenóxido, ArO^- .⁴⁷

Los fenoles son mucho más ácidos que los alcoholes debido a la estabilización por resonancia del ion fenóxido. Algunos fenoles, como los sustituidos con grupos nitro, se aproximan o sobrepasan en acidez a los ácidos carboxílicos.⁴⁷ Según su estructura, los fenoles sustituidos pueden ser más o menos ácidos que el fenol mismo. Como regla general, los fenoles con un sustituyente atrayente de electrones son más ácidos, ya que estabilizan el ion fenóxido al deslocalizar la carga negativa; mientras que los fenoles con sustituyentes donadores de electrones son menos ácidos.⁴⁷ La posición de un grupo alquilo de cadena larga como sustituyente puede influir significativamente sobre la solubilidad en las disoluciones de bases.⁶³

2.1.3 Reactividad

2.1.3.2 Reacciones por influencia del grupo hidroxilo

Las propiedades químicas del fenol se caracterizan por la influencia que ejercen entre sí el grupo hidroxilo y el anillo aromático.^{26,27} Gran parte de la química de los fenoles es similar a la de los alcoholes; así, pueden convertirse en ésteres por reacción con cloruros o anhídridos de ácido y en éteres por reacción con halogenuro de alquilo en presencia de bases. Algunos ésteres y éteres fenólicos son productos comercialmente importantes.^{47,63}

2.1.3.2 Sustitución electrofílica aromática

Una propiedad química de gran importancia es la alta reactividad que confiere el grupo OH^- al anillo aromático para las sustituciones electrofílicas; en efecto, el grupo hidroxilo es un sustituyente fuertemente activador y orientador *orto-para* en las reacciones de sustitución electrofílica aromática (SEA); de esta manera los fenoles son sustratos altamente reactivos en reacciones electrofílicas como halogenación, nitración y sulfonación, así como en el acoplamiento con sales de diazonio para producir colorantes azo. La susceptibilidad de los fenoles a la SEA es una consecuencia de la naturaleza rica en electrones de los anillos fenólicos. Si las condiciones estéricas así lo permiten se puede formar el 2- ó 4-monoderivado, el 2,6-diderivado o incluso el 2,4,6-triderivado.^{26,27,47,63}

2.1.3.3 Oxidación y reducción

Otra aspecto importante sobre la naturaleza rica en electrones de los anillos fenólicos es la facilidad que tienen estos compuestos de ser oxidados: el tratamiento de un fenol con cualquier agente oxidante fuerte produce una 2,5-ciclohexadieno-1,4-diona o quinona. La reacción ocurre en condiciones suaves a través de un mecanismo vía radicales libres.⁴⁷

Dependiendo del agente oxidante, el fenol también puede ser oxidado a una variedad de productos diferentes, tales como di- y trihidroxibencenos, bifenoles, óxido de difenileno y otros. Por otra parte, la reducción de los fenoles por destilación con zinc produce benceno, mientras que la hidrogenación catalítica produce ciclohexanol.⁶³

2.1.3.4 Reacciones de condensación

Las reacciones del fenol más importantes, en el aspecto comercial, son las de condensación.^{26,27} La condensación del fenol con anhídrido ftálico produce fenoltaleína. La reacción más importante de condensación de fenoles, se produce con el formaldehído para dar resinas fenólicas. Los fenoles que tienen un grupo alquilo en la posición *orto* o *para* son difuncionales para algunas condensaciones. Los fenoles *para*-sustituídos se utilizan para producir resinas lineales solubles en aceites.⁶³

2.1.4 Toxicidad

2.1.4.1 Fenoles tóxicos

La Comunidad Europea ha indicado que algunos fenoles, que son descargados en ambientes acuáticos, son tóxicos. Por otra parte, la EPA⁵⁵ ha publicado una lista de compuestos fenólicos contaminantes clasificados así por su toxicidad y persistencia en el medio ambiente (véase Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos fenólicos clasificados como tóxicos⁵⁵

Comisión de las Comunidades Europeas	
Directivo 76/464/EC	
2-Amino-4-clorofenol	4-Clorofenol
4-Cloro-3-metilfenol	Pentaclorofenol
2-Clorofenol	Triclorofenoles
3-Clorofenol	
EPA (Environmental Protection Agency)	
Fenol	4-Cloro-3-metilfenol
2-Metilfenol	3-Metilfenol
4-Metilfenol	2,4-Dimetilfenol
2-Clorofenol	2,4-Diclorofenol
2,6-Clorofenol	2,4,6-Triclorofenol
2,4,5-Triclorofenol	2,3,4,5-Tetraclorofenol
2,3,4,6-Tetraclorofenol	2,3,5,6-Tetraclorofenol
Pentaclorofenol	2-Nitrofenol
4-Nitrofenol	2,4-Dinitrofenol
Dinoseb (DNMP)	2-Ciclohexil-4,6-dinitrofenol
4,6-Dinitro-2-metilfenol	

2.1.4.2 Efectos tóxicos del fenol en el ser humano

El fenol es tóxico si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Se conoce que su absorción es rápida y que los síntomas de toxicidad aparecen muy pronto, produciendo debilidad muscular, convulsiones, coma e incluso la muerte; también puede producir daños en pulmones, hígado, riñones, páncreas y bazo. Cuando se inhala, se irritan las vías respiratorias y sus vapores pueden llegar a los pulmones y producir daños graves. Sus vapores también irritan los ojos y producen daños, desde inflamaciones hasta ceguera. Cuando se ingiere se absorbe por el tracto gastrointestinal y se producen quemaduras, convulsiones, fallas respiratorias; su ingestión es fatal, una dosis de aproximadamente 1 gramo produce la muerte.

Aunque no hay suficientes evidencias para decir que el fenol es cancerígeno, su exposición en la industria de la madera, se ha asociado con la cada vez mayor incidencia de cáncer en pulmones. Respecto a cambios mutagénicos inducidos por el fenol, éstos se han observado principalmente en ensayos con *E. coli*/Sd-4 y *Salmonella* TA. Se ha demostrado que produce daños en el sistema reproductor y en el período de gestación en ratas; en humanos únicamente se han observado daños en la placenta.^{22,26,58,67}

2.1.4.3 Efectos tóxicos de algunos compuestos fenólicos en seres humanos

En la siguiente tabla, se indican los efectos tóxicos de algunos compuestos fenólicos encontrados en aguas subterráneas, de acuerdo a The Water Encyclopedia, USA.⁶⁷

Tabla 3. Efectos tóxicos producidos por algunos compuestos fenólicos

Compuesto	Efectos tóxicos producidos
4-Nitrofenol	Daños en el sistema respiratorio
Fenoles (Ej. <i>p</i> -terbutil-fenol)	Irritación en la piel
2,4-Dinitrofenol	Irritación de ojos y de piel, daños en riñones, en el sistema nervioso central y en el aparato reproductor
Pentaclorofenol	Irritación de ojos y de piel, daños en el sistema respiratorio, en el sistema nervioso central y en el hígado.
2,4,6-Triclorofenol	Daños en el hígado, mutagenicidad, carcinogenicidad

2.1.4.4 Efectos tóxicos de algunos compuestos fenólicos en microorganismos y en animales

El fenol es muy tóxico para los peces y afecta el sabor del pescado si se encuentra presente en ambientes marinos, en una concentración de 0.1 a 1 ppm.³¹ Además, tiene efectos en la reproducción de organismos acuáticos.⁶⁷ En las tabla 4 se indican algunos límites de concentración de fenoles permisibles

para algunas especies. En la tabla 5 se tienen las concentraciones letales de fenol para algunas especies acuáticas. La tabla 6, señala los criterios de calidad del agua potable que se deben considerar para proteger la vida acuática. Finalmente, en la tabla 7 se indica el nivel máximo de fenoles permisible en ambientes acuáticos.

Tabla 4. Límites de fenoles permisibles para varias especies⁶⁴

Especie	Límite medio de tolerancia [ppm]	
	24 horas	48 horas
<i>D. magna</i>	100	100
<i>D. magna</i> joven	17*	7**
<i>D. magna</i> adulto	61*	21**
<i>L. macrochirus</i>	10-15*	---
<i>M. atipinna</i>	63*	22**

resultados para 25 horas, resultados para 50 horas

Tabla 5. Concentraciones letales de fenol en ambientes acuáticos⁶⁷

Especie	Concentración letal	Tiempo de exposición
Trucha arcoiris	6 ppm	3 horas
Perca	9 ppm	1 hora

Tabla 6. Criterios de calidad del agua potable para la protección de la vida acuática⁶⁷

Compuesto fenólico	Observaciones
Nitrofenoles	Se presenta toxicidad aguda al nivel de 230 ppb en especies de agua dulce y 4850 ppb en especies de agua salada.
Fenol	Niveles de 150 ppb son tóxicos para algas de agua dulce. Toxicidad aguda a un nivel de 10200 ppb para especies de agua dulce y 5800 para especies de agua salada. Toxicidad crónica para especies de agua dulce a un nivel de concentración de 2560 ppb.
2,4-Dimetilfenol	A un nivel de concentración de 2120 ppb en especies de agua dulce.
Compuestos fenólicos	No se recomiendan concentraciones superiores a 100 ppb para cualquier especie, en cualquier intervalo de tiempo.

Tabla 7. Guía para evaluar la calidad del agua en ambientes acuáticos⁶⁷

Substancia	Límite máximo
Compuestos fenólicos	1 ppm

2.1.4.5 Límites máximos permisibles

En las siguientes tablas se indican los límites máximos permisibles en agua potable, en agua marina y de río, en aguas residuales, en agua de uso industrial y en aguas para otros usos.

Tabla 8. Criterios Ecológicos de la calidad del agua NOM-CCA-031-ECOL/1993.⁵³ Descargas de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicio y el tratamiento de aguas residuales

Límites máximos permisibles para fenoles	
Promedio diario	Promedio Instantáneo
5 ppm	10 ppm

Tabla 9. Límites máximos permisibles de fenoles en la calidad del agua para consumo humano

Normatividad mexicana ⁵² NOM-127-SSA1-1994	Normatividad canadiense ⁶⁷	Comunidad europea ⁵⁵ Directivo:75/440/EEC
1 ppb	2 ppb	1-10 ppb

Tabla 10. Lineamientos para la calidad del agua potable para compuestos de importancia para la salud por la Organización Mundial para la Salud⁶⁷

Constituyente	Valor normado	Observaciones
Clorofenoles	No existe un valor normado relacionado con daños a la salud	Producen un olor desagradable al nivel de 0.1 ppb
Pentaclorofenol	10 ppb	---
2,4,6-Triclorofenol	10 ppb	---

Tabla 11. Límites máximos permisibles de fenoles en algunas industrias⁵³

Tipo de industria	Promedio diario [ppm]	Promedio instantáneo [ppm]	Norma
Industria productora de azúcar de caña	0.5	0.75	NOM-CCA-002-ECOL/1993
Industria de refinación de petróleo y petroquímica	1	1.2	NOM-CCA-003-ECOL/1993
Industria de productos plásticos y polímeros	0.5	0.75	NOM-CCA-005-ECOL/1993
Industria del hierro y acero	0.5	0.75	NOM-CCA-013-ECOL/1993
Industria textil	0.1	0.2	NOM-CCA-014-ECOL/1993
Industria de impregnación de productos de aserradero	0.1	0.2	NOM-CCA-019-ECOL/1993

Para industrias alimenticias como la cervecera, refresquera, enlatadora de alimentos, vegetales y frutas secas, congelados, industria azucarera, los fenoles no deben ser detectables.⁶⁷

Tabla 12. Criterios Ecológicos²³ - Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de la calidad del agua CE-CCA-001/89 - Diario Oficial de la Federación

Niveles máximos permisibles de fenoles [ppm]				
Compuesto	Fuente de abastecimiento de agua potable	Recreativo con contacto primario	Protección a la vida acuática	
			Agua dulce	Agua costera
			2-Clorofenol	0.03
2,4-Diclorofenol	0.03		0.02	
2,4-Dimetilfenol	0.40			
2,4-Dinitrofenol	0.07		0.02	0.05
Dinitro- <i>o</i> -cresol	0.01			0.01
Fenol	0.30	0.001	0.1	0.06
2-Nitrofenol y 4-nitrofenol	0.07		0.002	0.05
Pentaclorofenol	0.03		0.0005	0.0005

Tabla 13. Niveles máximos permisibles de fenol de acuerdo a The Water Encyclopedia⁶⁷

Nivel	Fuente de abastecimiento de agua potable	Recreativo con contacto primario		Protección a la vida acuática		
		Tipo de agua		Tipo de agua		Refugios de aves costera
		dulce	costera	dulce	costera	
Óptimo	1 ppb	5 ppb	50 ppb	0.1 ppb	0.5 ppb	5 ppb
Máximo	5 ppb	50 ppb	1 ppb	1 ppb	5 ppb	25 ppb

Nivel	Irrigación	Recreación Rema y pesca	Industrias de procesamiento de alimentos	
			Tipo de agua	
			dulce	costera
Óptimo	5 ppb	1 ppm	1 ppb	5 ppb
Máximo	20 ppb	10 ppm	10 ppb	50 ppb

2.1.5 Usos

2.1.5.1 Principales usos de los fenoles

La aplicación más importante del fenol, de los ácidos cresílicos y del *meta* y del *para*-cresol es la manufactura de resinas de fenol - formaldehído, y de resinas epoxi.^{22,27,47,63} Estas resinas se emplean como adhesivos en la industria maderera, en la automotriz y en la de construcción.²⁶

El fenol se ha utilizado como desinfectante; también se utiliza en la producción de antisépticos, preparaciones farmacéuticas, asbestos, baquelita, coque, explosivos (2,4,6-trinitrofenol), fertilizantes, pinturas, removedores de pinturas, perfumes, nylon, detergentes, plastificantes, antioxidantes, poliuretano, drogas, herbicidas, fungicidas, pesticidas, caucho, aditivos para gasolina, preservantes de madera. Es muy utilizado en la industria del petróleo, de la piel, del papel, del curtido, del jabón.^{22,27,63}

El fenol se utiliza como materia prima en la síntesis de fenoles clorados y conservadores de alimentos, como el BHT (hidroxitolueno butilado) y el BHA (hidroxianisol butilado).⁴⁷

Algunos fenoles tienen varios usos, como el pentaclorofenol que se utiliza para preservar la madera; el herbicida 2-4-D(ácido 2,4-diclorofenoxiacético se produce a partir de 2,4-diclorofenol; el antiséptico hexaclorofenol se obtiene a partir del 2,4,5-triclorofenol; el salicilato de metilo es un compuesto fenólico que se utiliza como agente saborizante.⁴⁷ La preparación de fosfatos de tricresil representa el mayor uso del *meta* y del *para*-cresol. Los cresoles y algunos derivados del fenol se utilizan ampliamente como desinfectantes.

Los alquilfenoles y los polifenoles se utilizan en la producción de tintes, farmacéuticos, plastificantes, antioxidantes, etc.; los butilfenoles, particularmente los terciarios, son materias primas de algunos importantes antioxidantes para caucho natural y sintético, y poliolefinas plásticas.⁶³

La hidroquinona es uno de los agentes reductores más ampliamente usados, se utiliza como revelador en fotografía; el pirogalol también es un importante agente reductor.⁶³

2.1.5.2 Fenoles encontrados en aguas residuales^{64,67}

A continuación se indican las industrias generadoras de algunos compuestos fenólicos.

Tabla 14. Procedencia de algunos compuestos fenólicos

Compuesto	Industria generadora
Dinitro- <i>o</i> -cresol	Producción de pesticidas
2,4-diclorofenol	Producción de pesticidas
<i>p</i> -Nitrofenol	Producción de colorantes
<i>p</i> -Aminofenol	Producción de colorantes
Fenol	Producción de resinas sintéticas, coque, gas natural, colorantes, refinación de aceite, Industria textil, Industria del curtido Industria del alquitrán e Industria química
<i>o</i> -Cresol, <i>m</i> -Cresol, <i>p</i> -Cresol	Manufactura de coque
Xilenol, etilfenol	Licor amoniacal (gas carbón)
Guaiacol, vainillina y ácido vainílico	Producción de pulpa de madera

2.2 Determinación de fenoles

2.2.1 Significado e importancia de la determinación de fenoles

La determinación de compuestos fenólicos juega un papel muy importante en la medición de la calidad del agua. El nivel de fenoles es un indicador de la presencia de contaminación procedente de fuentes industriales que trabajan con productos del petróleo, gas, coque, celulosa, papel, resinas sintéticas, textiles herbicidas, fungicidas, residuos de pesticidas, plástico, químicos orgánicos, colorantes, curtido de pieles y acero, entre otras.^{34,50}

Los fenoles no sólo provienen de fuentes industriales; frecuentemente se encuentran en aguas superficiales naturales, debido a que son constituyentes de algunas plantas e incluso se pueden formar durante procesos de humificación de los suelos.

Se consideran contaminantes debido a que provocan un incremento en la demanda de oxígeno; su presencia, aún en el nivel de ppb, en suministros de agua potable puede conducir, junto con el proceso de cloración, a la formación de clorofenoles que dan un sabor y olor desagradables al agua.^{12,50}

Todo ello ha provocado que existan ciertas restricciones para las industrias, con el fin de prevenir grandes descargas de fenoles. Estas medidas han

estimulado el desarrollo de procesos de desfenolización^a dentro del tratamiento de aguas residuales. El control de operación de estos procesos debe ser soportado por métodos analíticos confiables, que deben ser rápidos, aplicables en un intervalo amplio de concentraciones y capaces de determinar fenoles aún al nivel de ppb.

2.2.2 Métodos de determinación de fenoles

Existen varios métodos que sirven para determinar cuantitativamente a los fenoles; algunos de ellos se utilizaban anteriormente y otros son de más reciente aplicación.^{55,63}

2.2.2.1 Bromación

Es posible determinar fenoles mediante una reacción de bromación; la reacción es rápida y completa para el fenol y el *m*-cresol, la sustitución se da en las posiciones *orto* y *para*. Se utiliza una disolución de bromuro-bromato como fuente de bromo; el exceso de éste se hace reaccionar con yoduro de potasio, y el yodo producido en la reacción se titula con una disolución de tiosulfato de sodio.⁶³

2.2.2.2 Titulación acidimétrica

Debido a que los fenoles son débilmente ácidos pueden determinarse por medio de una titulación acidimétrica en un medio no acuoso; se han propuesto varios disolventes y titulantes; normalmente se utiliza hidróxido de tetrabutilamonio en benceno-metanol como titulante y piridina como disolvente.⁶³

2.2.2.3 Formación de aductos y nitración

Antes del desarrollo de la cromatografía de gases, la determinación de *orto* y *meta*-cresol, en mezclas, se efectuaba a través de la formación del aducto con cineol y la nitración de Raschig, respectivamente.⁶³

2.2.2.4 Espectroscopia de infrarrojo

En un inicio, la espectroscopia de infrarrojo se utilizó enormemente para determinar fenoles en mezclas, en un intervalo de concentración de 5 a 100 ppm, e incluso al nivel de 10 ppb. Con este método es posible determinar fenoles *para*-sustituidos, previa separación; sin embargo, no se pueden determinar fenoles *orto*-sustituidos.⁵⁰ El método es bastante complicado, incluye destilación fraccionada y el análisis de las fracciones separadas seguida por cálculos complicados para determinar las cantidades de los fenoles individuales presentes.

^a Entre los diversos tratamientos para eliminar fenoles de varios tipos de aguas los principales son: coagulación, floculación, adsorción con carbón activado, oxidación con ozono, siendo los más eficientes los dos últimos. con una efectividad de 90 a 100%.^{52, 67}

En la actualidad este método ya no se utiliza, la cromatografía de gases lo ha desplazado.⁶³

2.2.2.5 Espectroscopía ultravioleta

La espectroscopía ultravioleta ha sido muy utilizada para la determinación cuantitativa de fenoles.⁶³ El intervalo de concentración en donde generalmente se aplica es de 0.1 a 0.9 ppm, aunque es posible también trabajar al nivel de ppb. Una gran ventaja de este método es la posibilidad de determinar fenoles *orto*-, *meta*- y *para*-sustituidos; sin embargo, sólo es posible recuperar el 80% de fenol en el tratamiento de preparación de la muestra.⁵⁰

2.2.2.6 Colorimetría y espectroscopía visible

Para determinar concentraciones de fenoles a nivel de trazas en aguas naturales, aguas residuales y otros afluentes, existen varios procedimientos colorimétricos capaces de realizar determinaciones aún al nivel de ppb,⁶³ y son precisamente dos de éstos métodos los que se evalúan en este trabajo.

2.2.2.7 Método espectrofotométrico de Gibbs

Este método se utilizó durante muchos años, ya que es útil para determinar fenoles en intervalos de concentración de 0 a 10 ppm y de 0 a 100 ppb.⁵⁰ La reacción de Gibbs consiste en la condensación 2,6-dibromoquinona clorimida con el compuesto fenólico en la posición *para*, en medio alcalino (pH=9.4), para formar el compuesto colorido del dibromoindofenol, que tiene un máximo de absorción entre 610 y 630 nm.⁶³ Dentro de las desventajas que presenta este método, se tiene la falta de repetibilidad en la reacción, la inestabilidad de reactivos, además de que no es posible determinar el *p*-cresol.⁵⁰

2.2.2.8 Método espectrofotométrico del Nitrosofenol

Este método es útil para la determinación de *meta* y *para*-fenoles y consiste en hacer reaccionar al compuesto fenólico con ácido nitroso, previamente generado, para formar el nitrosofenol. El compuesto nitroso se enfría en un baño de hielo, se adiciona hidróxido de amonio alcohólico para finalmente formar la sal quinoidina, que es un compuesto colorido y que tiene un máximo de absorción en 420 nm. El intervalo de concentración en el que se puede trabajar es de 0 a 10 ppm, una de sus ventajas es que se puede determinar el *p*-cresol.⁵⁰

2.2.2.9 Método espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina

La reacción de la 4-aminoantipirina (4-AAP) ha sido adoptada por diferentes organismos normativos, nacionales e internacionales, como un método estándar para la determinación de compuestos fenólicos en aguas naturales y residuales.^{11,28,30,41,48} Es así que la Dirección General de Normas (México) recomienda este método en la norma NOM-AA-50-1981.⁵¹

En la literatura existe información que indica que el intervalo de concentración en el que se puede utilizar este método es de 0 a 100 ppb y de 100 a 2000 ppb.⁵⁰ Para concentraciones por encima de 100 ppb se utiliza el método directo y, para concentraciones inferiores, se utiliza el método con extracción, en el que se utiliza cloroformo para extraer el compuesto colorido.¹²

Los compuestos fenólicos volátiles se separan por destilación de las impurezas no volátiles. Posteriormente se hacen reaccionar a temperatura ambiente con la 4-aminoantipirina a un valor de pH, que puede ser de 10 ± 0.2 , como se indica en la mayoría de los protocolos sugeridos por organismos normativos,^{11,28,30,41,51} o de 7.9 ± 0.1 como también se ha recomendado⁴⁸; la reacción se lleva a cabo en presencia del ion ferricianuro como agente oxidante suave. Finalmente se forma un compuesto colorido que absorbe a 510 nm cuando se utiliza el método directo y a 460 nm cuando se realiza la extracción con cloroformo.

Algunos compuestos fenólicos con sustituyentes en la posición *para* no desarrollan color con la 4-aminoantipirina, el sustituyente nitro en posición *orto* impide la reacción y en posición *meta*, la inhibe parcialmente.

Entre algunas ventajas de este método se puede citar, entre otras, la reproducibilidad en los resultados y la estabilidad de los reactivos; sin embargo, como desventaja, el método es sensible a los cambios de pH.⁵⁰

2.2.2.10 Método espectrofotométrico del MBTH

El método del MBTH (Clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona), a comparación del método de la 4-AAP, permite la determinación de un número más grande de compuestos fenólicos, ya que el MBTH reacciona con el fenol no sólo en la posición *para*, sino también en la *orto* si la primera se encuentra ocupada. Otra de sus ventajas es que los productos finales tienen valores de absorptividad molar mayores y esto permite tener límites de detección más bajos.³⁴ Es por ello que se ha adoptado como un método estándar por la EPA.³⁰

El MBTH reacciona con fenoles en condiciones oxidativas para dar un compuesto colorido, que absorbe a 490 nm en cloroformo y a 520 nm en medio acuoso.

2.2.2.11 Cromatografía de gases

En la actualidad, la cromatografía de gases se utiliza ampliamente para la determinación de fenoles en mezclas (aún al nivel de trazas). Las principales ventajas de este método es que permite la determinación y la separación simultánea de fenoles, incluyendo isómeros. Los fenoles se pueden determinar en forma libre o como derivados. Frecuentemente se trabaja con derivados, ya que se eliminan las dificultades resultantes de la alta polaridad del grupo fenol.⁶³

2.2.3 Métodos recientes

Existen varios métodos de determinación de fenoles en aguas naturales y residuales que se han desarrollado en los últimos años,⁵⁵ como los que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 15. Métodos recientes de determinación de fenoles

Métodos
Polarografía ³
Polarografía oscilográfica ⁴
Sensores en amperometría ⁷
Voltametría ⁷
Potenciometría oscilográfica ⁷
Fluorimetría ⁷
Electrodos de membrana biocatalítica ⁵
Electrodos selectivos de iones ⁵
Biosensores ^{2,5,8}
Electroforesis capilar ^{4,7}
HPLC ^{3,5,8}
Cromatografía de gases ^{3,4,5,6,8,55}
Cromatografía de gases - Espectrometría de masas ^{5,7,55}
⁵¹ RMN ⁵
Quiluminiscencia por Inyección en Flujo ⁸
Análisis por Inyección en Flujo ^{6,7}

Las técnicas de extracción líquido-líquido o sólido-líquido, combinadas con cromatografía de gases o de líquidos, son de desarrollo reciente. Barceló y Benfenati han realizado varios estudios al respecto.^{21,55}

Los métodos que utilizan cromatografía de gases (extracción líquido-líquido); se sustituyen, cada vez más, por procedimientos de extracción sólido-líquido y cromatografía de líquidos. En efecto, éstos últimos evitan la manipulación de grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos y la derivatización de fenoles, que no es un proceso sencillo.

Otra técnica reciente, es la microextracción en fase sólida combinada con cromatografía de fluido supercrítico. La electroforesis capilar es una alternativa muy poderosa a las técnicas cromatográficas clásicas para la separación de analitos polares. Las técnicas biológicas, principalmente los inmunoensayos y biosensores, han tenido un gran auge en los últimos años debido a su respuesta rápida y a su bajo costo.⁵⁵

3. Determinación de compuestos fenólicos de acuerdo al método espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina (4-Amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona)

3.1 Principio del método

Los compuestos fenólicos volátiles se separan de las impurezas no volátiles por destilación, se hacen reaccionar a temperatura ambiente con la 4-aminoantipirina a pH 10 ± 0.2 , en presencia del ion ferricianuro como agente oxidante suave, para formar un compuesto colorido que absorbe a 510 nm en medio acuoso y a 460 nm en cloroformo.³¹

3.2 Reacción

La reacción específica del fenol con la 4-aminoantipirina es la siguiente:^{25,46}

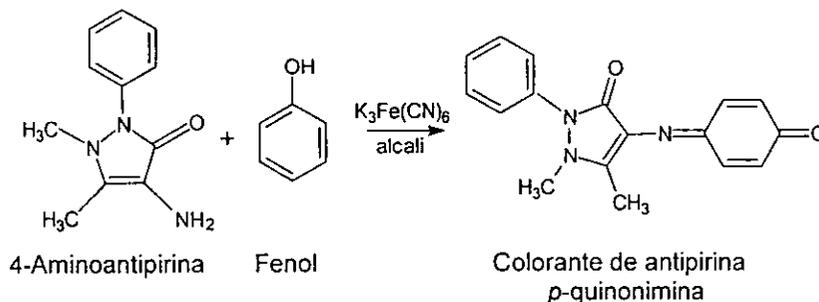


Figura 2. Reacción del fenol con la 4-Aminoantipirina

Color: de amarillo claro a naranja^{11,31} para el método con extracción rojo^{31,46} o rojizo-marrón²⁸, para el método directo.

3.3 Reactividad

La siguiente tabla indica la reactividad de algunos fenoles cuando se hacen reaccionar con la 4-AAP bajo las condiciones ya mencionadas.

Tabla 16. Reactividad de algunos fenoles frente a la 4-AAP

Posición	Tipo de sustituyente ^{25,54}	Reacción
<i>para</i>	$-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, -Arilo, -OCOR, -NO ₂ , -NO, -COAr, -CHO	No
<i>orto</i>	-NO ₂	No
<i>meta</i>	-NO ₂	Parcialmente
<i>para</i>	-OOCR, -X, -OH, -OCH ₃ , -SO ₃ H	Sí

3.4 Desarrollo del método

1. Inicialmente Emerson propuso el uso de la 4-aminoantipirina para desarrollar color con los fenoles. La reacción propuesta consiste en hacer reaccionar los fenoles con 4-aminoantipirina y un oxidante en medio alcalino, con el objeto de prevenir la formación de la antipirina roja.²⁵

De sus investigaciones se derivan varios aspectos importantes. Entre otros, que, en disolución amoniacal, el fenol y la 4-aminoantipirina forman con trazas de Cu^{2+} un precipitado rojo oscuro, cuando se burbujea aire en la disolución. Debido a las dificultades que presenta dicha práctica, es más conveniente utilizar como agente oxidante al ferricianuro de potasio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$.²⁵

El uso de la 4-aminoantipirina presenta ventajas por su gran sensibilidad para detectar fenoles y porque sus blancos dan prueba negativa. El color del producto de reacción puede ser de rojo a morado, dependiendo del tipo de fenol. Como precaución a considerar, se deben evitar excesos de agente oxidante ya da lugar a la decoloración del compuesto colorido.²⁵

Las conclusiones derivadas de los estudios de Emerson se mencionan a continuación:

- a) Los grupos hidroxilo no aromáticos, no producen compuestos coloridos. Debe estar presente por lo menos un grupo hidroxilo fenólico en la molécula para que la prueba sea positiva.
- b) Los sustituyentes en la posición *para* al grupo hidroxilo del fenol evitan la reacción; esto no sucede con los grupos halógeno, carboxilo, ácido sulfónico, hidroxilo, metoxilo, ya que es muy probable que éstos sean expulsados durante la misma.
- c) El grupo nitro en la posición *orto* evita la reacción, y en la posición *para* la inhibe parcialmente.
- d) La reacción de la 4-AAP con el fenol se da por la posición *para*.

Las evidencias encontradas por Emerson y que le permitieron aseverar que el enlace entre la 4-aminoantipirina y los fenoles se da en la posición *para* son las siguientes:

1. Cuando la posición *para* está ocupada por los grupos alquilo, arilo, éster, nitro, benzoilo, nitroso y aldehído, no se forma el producto colorido aunque la posición *orto* se encuentre libre. Por otra parte, cuando la posición *para* está ocupada por el grupo carboxilo o ácido sulfónico, los productos son solubles en cloroformo; esto no es común, ya que se sabe que los productos coloridos que tiene grupos ácidos no son solubles. Se puede deducir que dicha solubilidad se debe a que durante la reacción han sido expulsados los grupos ácidos. Además

se ha comprobado que cuando dichos grupos se encuentran en la posición *orto* o *meta*, los compuestos coloridos no son solubles.²⁵

2. Gottlieb y Marsh³⁶ desarrollaron un procedimiento para la aplicación del reactivo de Emerson (4-AAP) en la determinación de algunos fungicidas fenólicos. Por otra parte Martin⁴⁶ desarrolló un procedimiento para determinar fenoles en agua y salmuera.

De acuerdo a una recopilación realizada por Ettinger,³¹ éstas son algunas aportaciones realizadas por varios autores:

3. Según Emerson y Beegle todos los compuestos que dan prueba positiva tienen un sistema ceto-enol incorporado a la estructura del anillo aromático, pero no todos los compuestos aromáticos con dicho sistema dan resultados positivos.

4. Inicialmente, Emerson no hizo muchas recomendaciones relacionadas con el control del pH y únicamente señaló que éste tenía que ser lo suficientemente alto para evitar la formación de la antipirina roja. En otro estudio posterior, junto con Kelley, se indicó que el pH es una variable importante en la aplicación cuantitativa de la prueba.

5. Ettinger también cita que Gottlieb y Marsh recomiendan como intervalo de pH óptimo el comprendido entre 10.4 y 10.6. Generalmente en todas las investigaciones citadas se utiliza como oxidante al $K_3Fe(CN)_6$, en medio alcalino.

6. Por otra parte, en 1967 Faust y Mikulewicz³² estudiaron el efecto del pH a valores de 8 y 10; asimismo propusieron un mecanismo de reacción, la 4-AAP ataca electrofílicamente al fenol en la posición *para* en condiciones oxidativas alcalinas. Se pudo comprobar que a un valor de pH 8 la reactividad es mayor, ya que no se ven disminuidas las características electrofílicas de la 4-AAP, como sucede a pH 10. Esto se debe a que se da una competencia entre los iones OH^- , que se encuentran en la disolución, y el anillo aromático de los fenoles por la 4-AAP.

7. Con respecto al mecanismo de reacción, éstos son los estudios que se han realizado: En 1943, Emerson sugirió que, análogamente a las aminas aromáticas, la reacción del fenol con la 4-AAP conducía a la formación del aducto *p*-quinonimina:

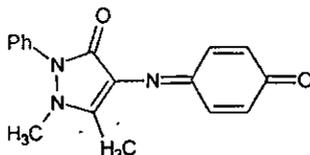


Figura 3. Estructura de la *p*-quinonimina²⁵

Se propuso que en el caso de los compuestos *para*-sustituídos el grupo era expulsado durante la reacción, pero no se dio ninguna explicación para dicha expulsión.

En una recopilación de estudios realizados al respecto, Jones y Johnson⁴² señalan varios aspectos importantes:

Emerson y Sagal apoyaron la existencia de la *p*-quinonimina. Mientras que Müller, al no encontrar evidencias de la expulsión de los grupos carboxilo o alcoxi, sugirió un acoplamiento en la posición *orto*.

Estudios posteriores confirmaron la hipótesis de Emerson; se aislaron compuestos coloridos de las reacciones de *p*-halofenoles y de los compuestos correspondientes sin sustituyentes en la posición *para*. Los productos resultaron ser idénticos, lo que confirma la eliminación del átomo de halógeno, con base en espectros en el visible fue posible concluir que también ocurre la expulsión de los grupos *p*-alcoxi y *p*-carboxi. Además, los resultados del análisis elemental de los compuestos coloridos correspondientes, conducen a fórmulas empíricas del aducto *p*-quinonimina esperado.

Una prueba más de la estructura de la *p*-quinonimina, es que el producto de la reacción de la *p*-benzoquinona con la 4-AAP es idéntico al obtenido de la oxidación del fenol. Sin embargo, Okano y Uekama sugirieron que la formación de complejos de transferencia de carga era responsable del color.⁴²

En 1973 Jones y Johnson retomaron la investigación de la reacción, utilizaron ¹RMN (Resonancia Magnética Nuclear de protón). En el caso del fenol y los *p*-cloro, -carboxi, y -metoxi derivados, se encontró que tenían espectros muy parecidos correspondientes a la estructura de la *p*-quinonimina.⁴²

El producto de la reacción de la *p*-benzoquinona con la 4-AAP fue idéntico al obtenido de la oxidación del fenol. Por consiguiente, los colores formados de *p*-quinonas y 4-AAP son debidos a la formación de *p*-quinoniminas y no a complejos de transferencia de carga, como se había sugerido anteriormente.

3.5 Factores que influyen en el desarrollo del compuesto colorido

a) Efecto del pH

Las variaciones de pH tienen un efecto en el desarrollo del color, es por ello que se deben tener ciertas precauciones.⁵⁰ Algunos autores recomiendan como intervalo de pH más adecuado el comprendido entre 9.8 y 10.2, cuando se utiliza amoníaco. Se ha observado que a pH mayor que 10.2, pequeñas diferencias de pH producen considerables cambios en la intensidad del color.

Algunos autores señalan que valores de pH menores que 9.8 son indeseables, ya que la anilina, y probablemente otros compuestos con sistemas ceto-enol, muestran una gran tendencia a dar una prueba positiva como los fenoles.³² Sin embargo, como ya se ha mencionado, Faust y Mikulewicz señalan que a un pH de 8 se tiene una mejor reactividad.³²

Por su parte, Ochynski ha indicado como intervalo de pH óptimo el comprendido entre 9 y 10.7.⁵⁴ Mientras que Shaw ha recomendado un valor de 10.4 ± 0.1 .⁶⁰

b) Efecto del tiempo

Se ha observado que el tiempo es una variable importante en la estabilidad del compuesto colorido.⁵⁰ El blanco, que contiene 4-AAP y ferricianuro de potasio en medio alcalino, se oscurece progresivamente; esto tal vez se debe a la oxidación de la 4-AAP. El producto colorido sufre una continua pérdida de color. La luz directa del sol o de una fuente artificial, también tienen un efecto de pérdida de color.⁴⁵

Cuando se utiliza el método directo, el color se desarrolla en 5 minutos, y no varía significativamente durante 150 minutos.⁵⁴ Otras fuentes indican 120⁶⁰ ó 190 minutos.⁴⁶ En el caso del método de la 4-AAP con extracción, el compuesto colorido puede ser estable durante 3 horas.³¹

c) Efecto de la temperatura

Se ha considerado que la temperatura es un factor importante que debe ser considerado en el desarrollo del compuesto colorido.⁵⁰ Interviene en la velocidad de cambio y desvanecimiento de color en mezclas de reacción acuosa y en extractos clorofórmicos. Es muy importante tener un control de ésta cuando se desea determinar cantidades pequeñas de fenol. Las variaciones de temperatura no afectan al blanco significativamente.³¹ En un intervalo de 19 a 37°C no se observan cambios en la concentración del compuesto colorido.⁵⁴

d) Efecto de la concentración de 4-AAP

El color del blanco es proporcional a la cantidad de 4-AAP. Por otra parte, aunque la reacción es rápida, se requiere un gran exceso de 4-AAP para producir un máximo color.⁶⁰ Cuando se utiliza la extracción, la cantidad de 4-AAP contribuye a la intensidad de color del blanco.³¹

Se ha demostrado que el grado de pureza de la 4-AAP no influye apreciablemente en la determinación. La disolución de 4-AAP es estable durante aproximadamente dos semanas si se guarda en un lugar oscuro y fresco,⁵⁴ y si se

conserva en un frasco ámbar puede durar varios meses, por lo cual no es necesario preparar la disolución cada vez que se utilice.¹

e) Efecto de la concentración de ferricianuro de potasio

Es necesario que el ferricianuro de potasio se encuentre en exceso con respecto a la cantidad de fenol presente en la muestra.⁶⁰ Cuando se realizan extracciones con cloroformo un exceso de ferricianuro de potasio no influye notablemente, ya que la cantidad que no reacciona no se extrae; sin embargo, cuando no se realizan extracciones es preciso controlar este factor.³¹

f) Efecto de las disoluciones amortiguadoras

No se observan diferencias cuando se utilizan disoluciones amortiguadoras de borato, fosfato o carbonato.⁵⁴ Martin cita que los estudios de Emerson han indicado que con el amoniaco, se tiene una mayor sensibilidad en la reacción.⁴⁶

g) Orden de adición de los reactivos

El orden de adición de los reactivos debe respetarse y se debe homogenizar la mezcla después de la adición de cada reactivo.⁶⁰ Cuando se mezclan 4-AAP y el oxidante se desarrolla un color rojo intenso, esto se debe a que la 4-AAP se ha oxidado. Es por esto que el álcali utilizado debe adicionarse en primer lugar³¹ para evitar dicha oxidación.⁵⁴

3.6 Sensibilidad y precisión

La sensibilidad es el incremento de la respuesta del instrumento con el aumento en la concentración.²⁰ En espectroscopía, es proporcional a la absorptividad del compuesto formado y depende del tipo de fenol;³¹ sin embargo, es posible incrementarla utilizando una extracción.²⁵ De acuerdo a estudios realizados con algunos hidrocarburos clorados se demostró que éstos pueden utilizarse para extraer el compuesto colorido de la mezcla de reacción.⁴⁶ Se ha elegido al cloroformo, ya estudiado por Emerson,²⁵ debido a que las extracciones realizadas con este disolvente son muy eficientes, la intensidad del color del extracto es estable. Por otra parte su costo, su disponibilidad y su toxicidad son aceptables.

Se ha indicado que para incrementar la sensibilidad y la precisión a bajas concentraciones, es recomendable utilizar 1000 mL de muestra en vez de 500 mL, con un volumen de cloroformo de 25 mL.³¹

Se ha observado que al filtrar los extractos clorofórmicos a través de un papel filtro que contiene sulfato de sodio anhidro, se remueve el agua emulsionada y aparentemente los extractos son más estables, lo que contribuye a tener precisión en los resultados.⁵⁰

3.7 Interferencias

Las interferencias más comunes que pueden estar presentes en aguas domésticas e industriales son: bacterias que descomponen al fenol, agentes oxidantes o reductores, especies alcalinas,^{11,41,50,51} y compuestos sulfurosos o aromáticos no fenólicos que en su estructura tienen un sistema ceto-enol. Además, son interferencias, todos aquellos compuestos que pueden colorear o dar opacidad a la muestra.⁵⁰

En determinadas condiciones algunas aminas pueden ser determinadas como fenoles.⁴¹ De acuerdo a un estudio realizado por Ochynski, los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} , las sales de hierro y la levadura no afectan la determinación de fenol en agua potable.⁵⁴ En la siguiente tabla se indican algunas compuestos que pueden interferir en la determinación de fenoles.

Tabla 17. Interferencias en la determinación de fenoles

Tipo de interferencia	Tratamiento
Degradación biológica	Adición de sulfato de cobre y acidificación con ácido fosfórico. ⁴¹ Acidificación con H_2SO_4 a pH menor que 4 ³⁰
Oxidantes	Adición de ácido ascórbico, ⁴¹ arsenito de sodio, sulfato de hierro o sulfato de hierro y amonio ^{11,28}
Reductores	Adición de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ⁴¹
Aminas	Destilación a pH menor que 0.5 ⁴¹
Sulfuros	Destilación, previa adición de sulfato de cobre ^{11,28,51} y acidificación de la muestra a pH menor que 4 con H_3PO_4 , HCl ó H_2SO_4 . ^{28,30,51} Adición de AgNO_3 ³⁵
Alquitrán, aceites y grasas	Extracción alcalina con CCl_4 ⁴¹

3.8 Tratamiento que recibe la muestra antes de ser analizada

Se recomienda que las muestras sean analizadas dentro de las primeras cuatro horas posteriores a su recolección, de lo contrario deben ser refrigeradas a una temperatura de 5 a 10°C hasta por 24 horas.^{28,51} Algunas otras fuentes recomiendan una temperatura entre 2 y 4°C. Para evitar la oxidación química o bioquímica, las muestras se pueden acidificar a valores de pH entre 0.5 y 2 con H_3PO_4 , HCl , H_2SO_4 o NaHSO_4 . Se debe adicionar sulfato de cobre para eliminar

sulfuros. Las muestras deben ser guardadas en recipientes de vidrio, no de plástico, y preferentemente se deben analizar en un intervalo de 48 horas posteriores a su colección.^{11,17}

La muestra debe ser clara e incolora, si se observa turbidez es necesario filtrarla;⁴⁶ esta operación permite remover sulfuros y mercaptanos después de una precipitación.⁵⁰ Sin embargo, para la mayoría de las muestras se requiere realizar una destilación con el propósito de remover las sustancias interferentes³⁰ como compuestos orgánicos, iones metálicos, que generan turbidez en la muestra.

3.9 Campo de aplicación

Este método es aplicable al análisis de aguas naturales (superficiales, subterráneas y marinas) y potables. También es posible utilizarlo con aguas residuales y municipales, si se tienen las debidas precauciones para contrarrestar los efectos de las interferencias. El método permite determinar fenoles a un nivel de 5 µg/L cuando el producto colorido se extrae y concentra. Normalmente se realiza la extracción con cloroformo cuando se desea determinar concentraciones de fenol inferiores al nivel de 50 µg/L;²⁸ otras fuentes indican 100µg/L;¹¹ cuando se rebasan estos valores es más conveniente utilizar el método directo. Con el método de la 4-AAP no es posible distinguir diferentes tipos de fenoles.^{28,30,51}

3.10 Ventajas

Existen otros métodos para determinar fenoles en aguas naturales y residuales; sin embargo, el método de la 4-aminoantipirina se ha utilizado durante varias décadas, ya que presenta varias ventajas frente a estos métodos. En un estudio comparativo⁵⁰ en el que se estudiaron cinco de los métodos más utilizados: Gibbs, Nitrosfenol, 4-Aminoantipirina, IR y UV, se evaluaron parámetros como sensibilidad, precisión, exactitud, interferencias, reactivos y otros más. Finalmente se demostró que el método de la 4-AAP es de fácil manipulación, rapidez en los análisis, reproducibilidad en las curvas de calibración, es aplicable en un intervalo amplio de concentraciones, los reactivos utilizados son estables y es el más preciso y exacto al nivel de ppb.^{31,46,54}

3.11 Desventajas

En aguas residuales, existen compuestos fenólicos que no pueden reaccionar para producir el compuesto colorido; existen otros que, aunque reaccionan, no presentan la misma sensibilidad que el fenol a los reactivos utilizados (ver tabla 18). Por otra parte, la presencia de sustituyentes sobre el anillo aromático disminuye la sensibilidad. Otra de las desventajas es que color producido por los compuestos fenólicos con la 4-AAP no es el mismo para todos

los compuestos. Esto dificulta la determinación ya que, durante ésta, las lecturas de absorbancia se realizan a una longitud de onda dada; si la muestra contiene una mezcla de compuestos fenólicos, con colores diferentes, algunos se podrán determinar de forma correcta, mientras que otros no.

Debido a que las muestras pueden contener una variedad de fenoles y a que no es posible encontrar una mezcla estándar, se ha elegido utilizar al fenol como un estándar. De esta forma cualquier color producido por la reacción de compuestos fenólicos se refiere como fenol o como índice de fenol (ISO 6439)⁴¹, que incluye a los compuestos fenólicos que reaccionan con la 4-AAP, bajo las condiciones especificadas, para dar compuestos coloridos,⁴¹ y representa la concentración mínima de compuestos fenólicos en una muestra.^{11,30}

4. Determinación de compuestos fenólicos de acuerdo al método espectrofotométrico del MBTH (clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona)

4.1 Principio del método

La tendencia hacia el abatimiento de la contaminación ha dado como resultado la necesidad de contar con un método que sea capaz de determinar una mayor cantidad de compuestos fenólicos. El método del MBTH, comparado con el método de la 4-AAP, permite la determinación de un número mayor de fenoles, ya que el MBTH reacciona con el fenol no sólo en la posición *para*, sino también en la *orto*, cuando la primera se encuentra ocupada; además los productos finales tienen valores de absorptividad mayor (ver tabla 18).^{33,34}

Tabla 18. Comparación la absorptividad molar del compuesto colorido (Métodos sin extracción)³³

Compuesto	Valores de absorptividad molar (ϵ) $\times 10^{-3}$	
	MBTH	MÉTODO 4-AAP
Fenol	26	14
4-Clorofenol	22	9
3-Cresol	23	9
2-Nitrofenol	14	7
3-Nitrofenol	20	5
4-Nitrofenol	2	No hay reacción
2,4-Diclorofenol	28	22

4.2 Reacción

El MBTH reacciona con fenoles en condiciones en las que se utiliza el sulfato amonocérico como oxidante para dar un compuesto colorido de acuerdo a la siguiente reacción:³³

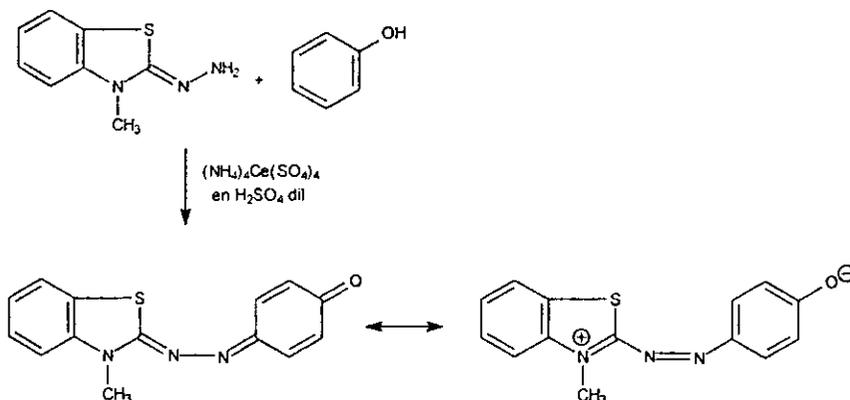


Figura 4. Reacción del fenol con el MBTH

El compuesto colorido muestra un máximo de absorción a una longitud de onda de 520 nm. Cuando se extrae con cloroformo se observa un desplazamiento a 490 nm.³⁰

4.3 Reactividad

El MBTH reacciona con el fenol en la posición *para*. Si esta posición se encuentra ocupada, el MBTH puede acoplarse en la posición *orto* libre.³⁰

4.4 Desarrollo del método

1. En 1957, Mohler y Jacob⁵⁰ realizaron una comparación de los cinco métodos más sensibles para determinar fenoles, de ahí que se concluyó que el método de la 4-AAP es el más rápido, exacto y preciso, es por ello que fue adoptado para el análisis de aguas residuales y de otra procedencia (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater)^{4d}. Sin embargo, la reacción de la 4-AAP tiene varias deficiencias, una de ellas es que no reacciona con gran variedad de fenoles sustituidos en la posición *para*, además es sensible a los cambios de pH.

2. Posteriormente Hünig y colaboradores^{39,40} informaron el descubrimiento de nuevos compuestos coloridos tipo azo, productos de la reacción oxidativa de acoplamiento entre el MBTH y fenoles, compuestos metilénicos reactivos o aminas aromáticas. Estas síntesis abrieron nuevas posibilidades para la determinación de compuestos fenólicos.

3. En los primeros experimentos con el MBTH se utilizó $K_3Fe(CN)_6$ como oxidante en medio alcalino. Aunque se obtuvieron resultados aceptables con algunos fenoles, con otros el rendimiento fue bajo. Por otra parte, se puso en evidencia que las aminas aromáticas y las quinonas también pueden reaccionar.^{39,40}

4. Más tarde, se utilizó como oxidante persulfato de amonio pero, debido a que la velocidad de reacción es lenta, fue descartado.⁵⁴

5. En 1964 Masuo Umeda informó que cuando se utiliza sulfato amonocérico, en medio ácido, el rendimiento se incrementa notablemente. También se mencionó que la presencia de grupos negativos en la posición *para* retarda la formación de color.⁶⁹ La disolución debe contener la cantidad de H_2SO_4 requerida para obtener la acidez óptima para la reacción, ya que el hidróxido de cerio empieza a precipitar a pH mayores que 0.8.³³

En ese mismo estudio, se demostró que la concentración de sulfato amonocérico no debe ser alta, ya que un exceso conduce a una oxidación del MBTH.³⁷

6. Friestad señala que, una vez que la reacción se ha producido, es conveniente tener un medio alcalino, ya que disminuye el color de fondo (se refiere a la absorción en la disolución ocasionada por la presencia de especies absorbentes diferentes a la de interés¹²) e incrementa los valores de absorbancia de los compuestos coloridos. Para prevenir la precipitación del hidróxido de cerio, que se produce con el incremento del pH, se adiciona EDTA a la disolución alcalina. Es recomendable adicionar etanol a dicha disolución, ya que éste tiene un efecto estabilizante para algunos compuestos coloridos.^{33,37}

En estas condiciones las absorbancias de la mayoría de los compuestos coloridos permanecen estables durante aproximadamente 90 minutos.

4.5 Interferencias

Debido a que el MBTH también reacciona con aldehídos alifáticos, carbazoles, compuestos azo, estilbenos, bases de Schiff, aminas aromáticas y compuestos imino heteroaromáticos,³³ se debe evitar la presencia de todos estos compuestos. No obstante, las condiciones de reacción son ácidas y la mayoría de

estos compuestos no provoca interferencias en este medio. La excepción son los aldehídos y las aminas aromáticas que deben ser removidos porque sus valores de absorptividad molar son elevados.^{30,38,57} Cuando la muestra se destila, los aldehídos no se eliminan y las aminas aromáticas sí; además se tienen evidencias de que los aminofenoles no destilan bajo condiciones ácidas fuertes.

Usualmente el etanol contiene acetaldehído como impureza, esto se debe evitar ya que interfiere en la determinación. La acetona también reacciona con el MBTH, es por ello también que se debe evitar su presencia.

4.6 Tratamiento de la muestra previo a su análisis

La muestra se debe mantener a una temperatura de aproximadamente 4°C. Para la mayoría de las muestras se requiere la destilación con el fin de remover materiales interferentes. Las interferencias de compuestos sulfurosos y la degradación biológica se eliminan con la acidificación de la muestra a un valor de pH menor que 4 con H₂SO₄ y con la aireación por agitación breve. Los fosfatos pueden precipitar, por lo que el ácido fosfórico no debe utilizarse para preservar la muestra.³⁰

4.7 Campo de aplicación

Este método es aplicable al análisis de aguas naturales (superficiales, subterráneas y marinas) y potables, así como residuales y municipales. Con el método es posible determinar fenoles en un intervalo de concentración de 50 a 1000 µg/L; para concentraciones inferiores a 50 µg/L es conveniente realizar la extracción con cloroformo, de esta forma es posible determinar fenoles al nivel de 2 µg/L. De la misma manera que el método de la 4-AAP, con este método no es posible diferenciar distintos tipos de fenoles.³⁰

4.8 Ventajas

La reacción de fenoles con MBTH es más sensible que con 4-AAP; además el MBTH reacciona con compuestos fenólicos con los que la 4-AAP es incapaz de reaccionar, algunos de ellos se encuentran sustituidos en la posición *para*. Además, los valores de absorptividad molar son mayores con el método del MBTH.^{33,37}

En un estudio comparativo se demostró que con el método del MBTH el compuesto colorido se puede extraer al 100% con una sola extracción, en cloroformo; en el caso del método de la 4-AAP se requieren dos.³⁷

Otra de las ventajas del método del MBTH es que no se ve afectado por los cambios de pH, según estudios realizados por Goulden.³⁷

4.9 Desventajas del método

El color producido con el MBTH no es el mismo para todos los compuestos fenólicos, puede ir de rojo a violeta con máximos de absorbancia situados de 460 a 595nm; esto es una gran desventaja ya que las aguas residuales pueden contener gran variedad de fenoles.^{30,33,34} Por los mismos motivos señalados en el caso del método de la 4-aminoantipirina, no es posible encontrar una mezcla estándar. Por esta razón, se ha elegido al fenol como un estándar y así, cualquier color producido por la reacción se refiere a este compuesto. Este valor representa la concentración mínima de compuestos fenólicos presentes en una muestra.³⁰

El MBTH se utiliza para determinar aldehídos alifáticos, si se encuentra una cantidad de estos compuestos en la muestra se presentan interferencias ya que como la muestra se encuentra en medio ácido se facilita la reacción del MBTH con los aldehídos y se produce un compuesto catiónico de color azul con máximos de absorbancia situados en 635 y 670 nm.^{38,57}

5. Espectroscopia de absorción

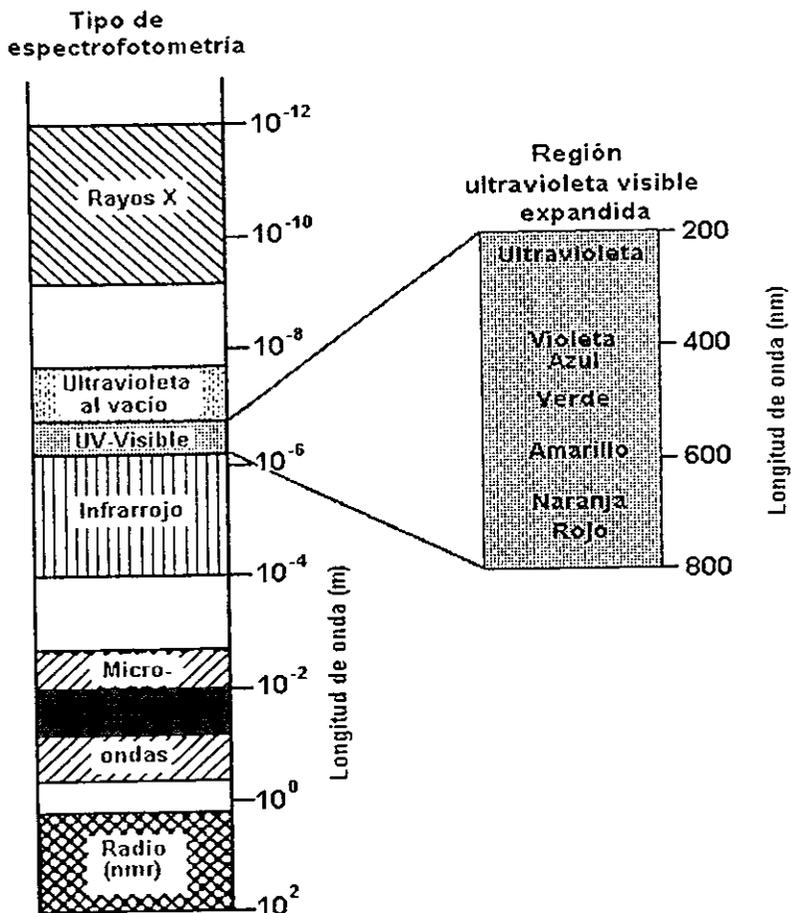
Los métodos espectroscópicos son técnicas instrumentales muy utilizadas en el análisis cuantitativo y en el cualitativo. Se clasifican según la región del espectro electromagnético implicada; siendo las más importantes las regiones de rayos X, ultravioleta, visible, infrarroja, microondas y radiofrecuencia.^{61,62}

Los métodos espectroscópicos de absorción para el análisis de muestras se basan en la medición indirecta de la radiación electromagnética absorbida por la materia, tomando en cuenta que la potencia de la radiación electromagnética disminuye como consecuencia de la absorción que se produce en la interacción con el analito.⁶²

5.1 Espectro electromagnético

El espectro electromagnético abarca un intervalo muy amplio de longitudes de onda. La siguiente figura representa las regiones del espectro electromagnético empleadas en el análisis químico.⁶²

Figura 5. Regiones del espectro electromagnético analíticamente útiles



La naturaleza de todas estas radiaciones es la misma; sus diferencias radican en la frecuencia, la longitud de onda y los efectos que producen sobre la materia. La interacción de la materia con la radiación ocurre en todo el espectro electromagnético.⁷⁰

5.2 Absorción de radiación electromagnética

Se denomina absorción al proceso por el cual una especie, en un medio transparente, capta selectivamente ciertas frecuencias de la radiación electromagnética. El fotón absorbido hace pasar la especie M a un estado excitado:⁶²

$$M + h\nu \rightarrow M^*$$

5.3 Absorción en las regiones ultravioleta y visible

Las energías necesarias para producir transiciones de los electrones externos de una molécula corresponden a radiaciones en las regiones ultravioleta y visible. Los espectros moleculares se caracterizan por presentar bandas de absorción que comprenden un amplio intervalo de longitudes de onda.⁶²

Las medidas de absorción en las regiones visible y ultravioleta del espectro proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre moléculas de interés orgánico, inorgánico y bioquímico.

5.4 Medición cuantitativa de la absorción

5.4.1 Ley de Lambert -Beer

La absorción se mide al determinar la disminución de potencia que experimenta un haz de radiación; como resultado de las interacciones con las especies absorbentes situadas en la trayectoria de dicho haz. De ahí se puede deducir la *ley de Lambert-Beer*:^{13,61,62}

$$\log P_0/P = kbc = A$$

El término *k* es una constante de proporcionalidad denominada *absortividad*, cuyo valor depende de la estructura de la molécula, de la longitud de onda de la radiación incidente, del disolvente y del índice de refracción de la disolución. Cuando la concentración, *c*, se expresa en mol/L, *k* se denomina *absortividad molar* y se representa por ϵ , cuyas unidades son: mol⁻¹cm⁻¹L. La longitud del paso óptico se representa por *b* o por *l*, y se expresa en cm. El logaritmo (en base 10) de la relación entre la potencia incidente y la transmitida se denomina *absorbancia* a la que se da el símbolo *A*.^{61,62}

5.4.2 Ley de aditividad de absorbancias

La ley de Beer se cumple igualmente en disoluciones que contiene más de una especie absorbente, siempre y cuando no haya interacción entre las mismas; para un sistema multicomponente, la relación será:^{12,13,62}

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1bc_1 + \epsilon_2bc_2 + \dots + \epsilon_nbc_n$$

donde los subíndices se refieren a las especies absorbentes 1,2, ..., n.

5.4.3 Limitaciones de la ley de Beer

Frecuentemente se observan desviaciones de la proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración (cuando b es constante). Algunas de estas desviaciones son importantes y representan limitaciones inherentes a la ley debidas a la falta de monocromaticidad del haz de luz; también se suelen presentar desviaciones cuando el soluto se encuentra en disoluciones concentradas (como consecuencia de interacciones entre las especies presentes en la disolución). Otras desviaciones ocurren como consecuencia de la forma en que se realizan las medidas de absorbancia (*desviaciones instrumentales*), o como consecuencia de reacciones en las que participan las especies absorbentes (*desviaciones químicas*).^{61,62,70}

5.5 Análisis espectrofotométrico cuantitativo

La espectroscopía de absorción en las regiones de ultravioleta y visible es una de las herramientas más utilizadas para el análisis cuantitativo por los siguientes factores:^{12,62}

- a) Amplio dominio de aplicación
- b) Gran sensibilidad
- c) Selectividad
- d) Precisión
- e) Exactitud

Su campo de aplicación es muy amplio ya que es posible analizar especies absorbentes y no absorbentes, esto último se logra haciendo reaccionar la especie no absorbente con un grupo cromóforo.

Los pasos principales en un análisis espectrofotométrico, consisten en establecer las condiciones de trabajo y preparar una curva de calibración que relacione la concentración con la absorbancia; la medición de ésta se realiza a una longitud de onda que corresponda a un máximo de absorción. La curva de calibración debe abarcar el intervalo de concentración, dentro del cual se espera que se encuentren las muestras que se van a analizar.^{12,61}

La naturaleza del disolvente, el pH de la disolución, la temperatura, la concentración de electrolitos y la presencia de sustancias interferentes, son variables que pueden influir en la absorción de una sustancia.⁶¹

Por lo anterior, es de gran importancia que, previo al análisis cuantitativo, se efectúe un estudio sobre la especificidad del reactivo empleado para producir absorción, la validez de la Ley de Beer, el efecto de sales, el disolvente, el pH, la temperatura, la concentración de reactivos, así como el orden de adición de los mismos, el tiempo requerido para el desarrollo del color y la estabilidad del mismo, el espectro de absorción del reactivo y de las sustancias absorbentes y el intervalo óptimo de concentración para el análisis cuantitativo.¹²

6. Desarrollo y evaluación de métodos analíticos

6.1 Métodos analíticos

Los métodos analíticos son de gran importancia, y deben ser confiables, principalmente cuando involucran mediciones en muestras ambientales; ya que éstas influyen en la toma de decisiones relacionadas con el cuidado de la salud pública y el mejoramiento de la calidad del medio ambiente.⁴⁴

6.1.1 Definición de método analítico

Un método analítico es una serie de instrucciones, adecuadamente redactadas, que definen completamente el procedimiento que debe seguirse con el propósito de obtener los resultados analíticos requeridos.⁷¹

6.1.2 Método propuesto

Es aquel método que ha sido modificado o creado por un laboratorio u organismo; pero que no ha sido evaluado por pruebas interlaboratorio.¹⁰

6.1.3 Métodos normalizados

Son métodos que han sido aceptados para un determinado propósito, después de haber sido probados a través de una prueba interlaboratorio; en la que cierto número de laboratorios utiliza el procedimiento propuesto para analizar un número seleccionado de muestras con el fin de determinar el sesgo y la precisión del método.⁴⁸

Existen diferentes organizaciones reconocidas que producen estos métodos normalizados, en los Estados Unidos de América se encuentran las siguientes:²⁴

- ASTM - American Society for Testing and Materials
(Asociación Americana para Pruebas y Materiales)
- ANSI - American National Standards Institute
(Instituto Nacional Americano de Normas)
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists
(Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
- APHA - American Public Health Association
(Asociación Americana para la Salud Pública)
- AWWA - American Water Work Association
(Asociación Americana del Agua)
- WEF - Water Environment Federation (Federación Ambiental del Agua)

Las tres últimas editan el libro: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales).⁴⁸

Es importante señalar, que los laboratorios que utilizan métodos generados por estas organizaciones tienen menos riesgo de cometer errores.²⁴

6.1.4 Métodos oficiales

Un método oficial usualmente es producido o adoptado por una organización gubernamental; debido a su importancia, estos métodos deben ser validados antes de que se puedan declarar como métodos oficiales.

En los Estados Unidos de América se encuentran las siguientes organizaciones que se encargan de producir métodos oficiales:²⁴

- EPA - Environmental Protection Agency
(Agencia de Protección del Medio Ambiente)
- NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health
(Instituto Nacional de Seguridad y Salud Laboral)
- FDA - Food and Drug Administration
(Administración de Alimentos y Drogas)

6.1.5 Métodos normalizados para la determinación de fenoles

Existen diferentes métodos de la determinación de fenoles, que han sido normalizados, como los siguientes:

Tabla 19. Métodos normalizados para la determinación de fenoles

Denominación	Método	Organismo
NOM-AA-50-1981	4-AAP con extracción	DGN ⁵¹
D 1783-87	4-AAP con y sin extracción	ASTM ¹¹
Method 6439	4-AAP con y sin extracción	ISO, 1990 ⁴¹
Method 420.1	4-AAP con y sin extracción	EPA-600/4-79-020 ²⁸
Method 9065 A	4-AAP con y sin extracción	EPA SW-846-1986 ³⁰
Method 716-57	4-AAP con y sin extracción	API ¹
Method 5530	4-AAP con y sin extracción	Standard Methods ⁴⁸
Method 9067 A	MBTH con y sin extracción	EPA SW-846-1986 ³⁰
Method 8040	Cromatografía de gases	EPA SW-846-1986 ³⁰
D 2580-89	Cromatografía de Gas-Líquido	ASTM 1991 ¹⁶
Method 6420	Cromatografía de gases con extracción líquido-líquido	Standard Methods ⁴⁸
Method 716-58	Infrarrojo	API ¹

DGN: Dirección General de Normas,
SECOFI (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial), México.

ISO: International Standard Organization
(Organización Internacional de Normalización)

API: American Petroleum Institute
(Instituto Americano del Petróleo)

6.1.6 Elección de un método analítico

La elección del método analítico se debe realizar después de considerar varios factores como: el nivel de analito que se desea determinar, la naturaleza y la cantidad de muestra disponible, el material, los reactivos, el equipo necesario, el costo, las ventajas, los factores de seguridad, la precisión, la exactitud, el intervalo de trabajo, el límite de detección, el tiempo requerido, las interferencias, el grado de validación que se requiere, etc.^{24,44}

Para algunos autores son de gran importancia la sensibilidad, la precisión, la exactitud y la selectividad;⁷¹ esta elección depende del propósito que se persigue.⁶⁸

6.1.7 Desempeño del método

Entre los diferentes parámetros que se utilizan para determinar si el desempeño de un método es adecuado, se encuentran la precisión, la exactitud, el límite de detección,⁴⁸ algunos otros autores indican que también es de importancia el intervalo de concentración cubierto por un método analítico.⁷²

Con el propósito de asegurar un adecuado desempeño del método es conveniente tener un control de calidad, que asegure que el método se encuentra bajo control y que se satisfacen los requisitos relativos a la calidad.^{48,56} Dentro de las principales fuentes que pueden ser la causa de error sistemático en los resultados analíticos tenemos, entre otras, las determinaciones de la lectura del blanco, la calibración del equipo y las interferencias.⁷³ Para evaluar el desempeño de un método analítico es conveniente realizar pruebas interlaboratorio.⁹

6.2 Validación de métodos analíticos

La validación es un proceso experimental de gran importancia, que involucra la colaboración externa de varios laboratorios, métodos o materiales de referencia, con el fin de verificar que la metodología a seguir se basa en principios técnicos bien fundamentados y es capaz de proporcionar datos analíticos confiables para un determinado propósito.^{44,56,66,68}

Diferentes organismos recomiendan el uso de métodos validados,⁶⁶ ya que garantizan un buen desempeño del método y la obtención de resultados confiables.

Cualquier método nuevo o modificado debe validarse, con el propósito de demostrar que es apropiado para ciertos fines y para determinar su precisión y exactitud.^{24,48}

Es importante señalar que aunque los métodos hayan sido previamente validados, no se debe asumir que son válidos para una determinada situación, ya que se pueden presentar diferencias de composición de matriz, cambios de

reactivos, etc.; es por ello que el laboratorio de prueba tiene la responsabilidad de probar la validez de la metodología para aplicaciones específicas y la propia habilidad de los usuarios para poner ésta en la práctica; a este procedimiento también se le conoce como verificación de un método y es de gran importancia ya que un método validado no es suficiente para la producción de datos válidos, la mayoría de los métodos requiere del grado de habilidad alcanzado por los analistas.⁶⁶

La validación de los métodos de análisis ambiental depende de las características de los mismos. Los procedimientos de validación deben considerar, entre varios aspectos, el muestreo, el manejo de las muestras, la calibración y desempeño de los instrumentos y del sistema analítico y los cálculos a desarrollar.¹⁵

De acuerdo a Taylor, el procedimiento general de validación de una metodología, incluye la determinación de la precisión y del sesgo, éste último parámetro se puede evaluar a través de Materiales de referencia, si no se encuentran disponibles, se pueden realizar comparaciones con otro método que es confiable pero que por algunas razones no es conveniente utilizarlo para los propósitos requeridos, también se pueden utilizar muestras adicionales o materiales de referencia análogos.⁶⁶

A continuación se enlistan algunos de los requisitos para la validación de un método de acuerdo a diferentes organismos:

Exactitud: Grado de concordancia entre el valor obtenido y el verdadero.^{24,56}

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el proceso experimental repetidas veces.^{24,56}

*Límite de detección** ^{24,56}

*Límite de cuantificación** ⁵⁶

Selectividad y especificidad: Nivel al que puede determinarse un analito en una mezcla compleja sin interferencias.⁵⁶

Intervalo de concentración aplicable: es aquel en el que se pueden obtener una exactitud y precisión razonables.^{24,56}

*Linealidad*⁵⁶

Sensibilidad: Es la diferencia en la concentración de analito que corresponde a la diferencia más pequeña en la respuesta del método que puede detectarse.⁵⁶

Solidez (Robustez, rigurosidad): Es el efecto de las variaciones de un procedimiento sobre los resultados de un método⁵⁶ se refiere a un examen de la estabilidad del resultado producido cuando se modifican las distintas etapas del método.^{24,48}

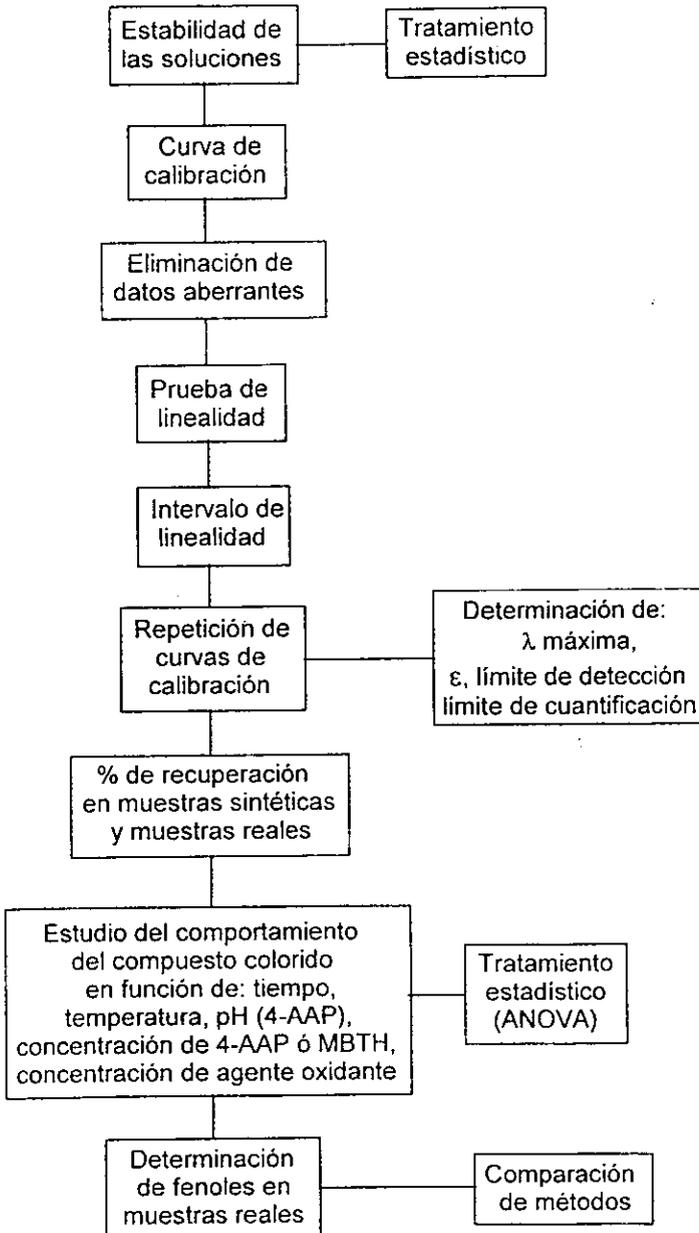
* La definición de encuentra en la página 50.

METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL
Y
RESULTADOS

7. Metodología experimental y resultados

7.1 Procedimiento general

7.1.1 Diagrama de flujo del procedimiento general



7.1.2 Equipo

Espectrofotómetro PERKIN ELMER UV/VIS Lambda 2

(λ seleccionable 190-1100 nm),

equipado con celdas de vidrio apareadas de 1 cm de paso óptico y con tapa.

Medidor de pH CONDUCTRONIC PC/8 digital con electrodo de vidrio combinado

Balanza analítica marca Mettler, modelo AE 163, fecha de calibración: 14/Jun/95

Equipo purificador de agua MILLI-R010 PLUS

Equipo de destilación que incluye: canastilla de calentamiento con reóstato

integrado Electromante, matraz bola de 1 L, T de destilación, refrigerante recto

y colector

7.1.3 Material

Embudos de separación de 1 L, con tapón esmerilado y llave de teflón

Probetas graduadas

Matraces volumétricos de clase "A"

Pipetas volumétricas de clase "A"

Buretas de clase "A"

Matraces Erlenmeyer

Matraz kitasato

Embudo Buchner

Papel filtro Whatman N° 40, disco de 11 cm de diámetro

Papel filtro Advantec 3B, disco de 7 cm de diámetro

7.1.4 Reactivos

Para realizar el trabajo experimental se utilizaron:

4-Aminoantipirina (4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona, $C_{11}H_{13}N_3O$) de 98% de pureza y punto de fusión de 108-110°C, marcas Aldrich y Fluka; clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona ($C_8H_{10}ClN_3S$, MBTH) de 99% de pureza, marca Merck; ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) al 99.6%, marca Baker; etilendinitrilotetracetato disódico ($Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8$, EDTA, sal disódica) al 99.4 %, marca Baker; ácido bórico (H_3BO_3) al 99.8%, marca Baker. Estos reactivos se utilizaron como tal, sin purificación previa para su uso.

Los siguientes reactivos fueron de grado analítico:

Fenol (C_6H_5OH) marca Merck, sulfato amonocérico dihidratado ($Ce(SO_4)_2 \cdot 2(NH_4)_2SO_4 \cdot 2H_2O$) marca Sigma, tiosulfato de sodio pentahidratado ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) marca Merck, dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) marca Merck, cloruro de amonio (NH_4Cl) marca Productos Químicos Monterrey, hidróxido de amonio (NH_4OH) al 28% marca Malinkrodt, bromato de potasio ($KBrO_3$) y bromuro de potasio (KBr) marca Química Dinámica, yoduro de potasio (KI) y bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) marca Productos Químicos Monterrey, sulfato de sodio anhidro granulado (Na_2SO_4) marca Merck, almidón soluble marca Técnica Química, cloruro de sodio ($NaCl$) marca Química Dinámica, hidróxido de sodio

(NaOH) marca Baker, ácido clorhídrico al 36% (HCl) marca Malinkrodt, ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) marca Malinkrodt, alcohol etílico (C₂H₅OH) marca Omnichem, cloroformo (CHCl₃) marca Baxter, disoluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10 marca Merck.

7.1.5 Disoluciones

Se prepararon las siguientes disoluciones con agua previamente purificada con un equipo Millipore:

Almidón 2%, se disolvieron 2 g de almidón en agua caliente, se adicionaron unas gotas de tolueno como agente preservante, se completó a 100 mL.

4-Aminoantipirina 0.5, 2 y 5%.

Bromato-bromuro, se disolvieron 1.4 g de KBrO₃, posteriormente se adicionaron 5g de KBr, se diluyó y se completó a 500 mL.

Disolución amortiguadora de pH, se disolvieron 8 g de NaOH, 2 g de EDTA y 8 g de ácido bórico en aproximadamente 200 mL de agua y se completó a 250 mL.

Disolución amortiguadora de pH de trabajo, se mezclaron volúmenes iguales de la disolución amortiguadora de pH y etanol.

Cloruro de amonio 5%

Dicromato de potasio 0.025 N, se pesó 0.31 g que ha sido previamente secado a 120°C durante 3 horas.

Ferricianuro de potasio 4, 8 y 12%

Fenol 1000 ppm (disolución de reserva), se disolvieron 1000 mg en agua recién hervida y enfriada, se completó a 1000 mL, su composición se determinó por titulación.

Fenol 50 ppm (disolución intermedia), se tomaron 5 mL de la disolución de reserva y se diluyeron con agua recién hervida y enfriada, se completó a 100 mL.

Fenol 5 ppm (patrón de trabajo), se tomaron 10 mL de la disolución intermedia y se diluyeron con agua recién hervida y enfriada, se completó a 100 mL.

MBTH 0.375, 0.05, 0.0625, 0.2 y 3%

Sulfato cérico amoniacal 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5%, se adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado por cada 100 mL de disolución.

Tiosulfato de sodio 0.025 N, se disolvieron 6.205 g en agua recién hervida y enfriada, se adicionaron 2 mL de cloroformo como agente preservante y se completó a 1000 mL.

7.2 Estabilidad de las disoluciones

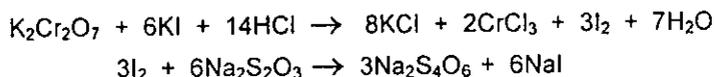
7.2.1 Normalización de la disolución de tiosulfato de sodio

7.2.1.1 Reacciones

La normalización de la disolución de tiosulfato de sodio se efectuó utilizando el método tradicional,^{59,63} se trabajó con una disolución de K₂Cr₂O₇ como patrón primario, al que se hace reaccionar con KI en medio ácido para

producir I₂, que finalmente reacciona con la disolución de Na₂S₂O₃ que se desea normalizar; se utiliza disolución de almidón como indicador.

Reacciones:



7.2.1.2 Procedimiento experimental

A 25 mL de agua que contienen 0.6 g de KI y 0.4 g de NaHCO₃, se adiciona 1 mL de HCl concentrado, se tapa el recipiente y se agita; posteriormente se adicionan 10 mL de disolución de K₂Cr₂O₇, que ha sido preparada previamente y de la cual se conoce su concentración, se agita y se deja reposar en la oscuridad durante 5 minutos. Transcurrido este lapso de tiempo, se procede a adicionar poco a poco la disolución de Na₂S₂O₃ que se desea titular, en el momento en que se tenga un color paja se adicionan aproximadamente 2 mL de disolución de almidón, la disolución adquiere un color azul fuerte, se continúa con la adición de Na₂S₂O₃ hasta que la disolución esté transparente; el matraz de la disolución se mantiene en agitación durante la titulación, finalmente se registra el volumen de titulante gastado.

7.2.1.3 Resultados

a) Cálculo de la concentración

Las determinaciones se realizaron por duplicado, se calculó el promedio y finalmente se determinó la normalidad del tiosulfato de sodio con base en la siguiente relación:

$$C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{C_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \times 10 \text{ mL de disolución de K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ consumido}}$$

Los resultados de las normalizaciones se presentan en la Tabla I-A y en la Gráfica I-A del Anexo I. Se realizó el tratamiento estadístico de los mismos con el fin de definir el intervalo de tiempo en el que la disolución es estable.

Dentro del tratamiento estadístico se utilizó el Análisis de varianza (conocido como ANOVA, del inglés Analysis of Variance), que se utiliza cuando se desea comparar más de dos medias^b. Para ello se separan y estiman las diferentes causas de variación que provienen principalmente de dos fuentes, una de ellas se encuentra siempre presente y se debe al error aleatorio involucrado en las mediciones, la otra se debe a lo que se conoce como factor controlado o de

^b La media es la suma de todas las mediciones dividida por el número de mediciones⁴⁹

efecto fijo, que pueden ser variaciones en el método o en las condiciones en las que éste se lleva a cabo. Así se puede probar si una alteración del factor del control ocasiona diferencias significativas.⁴⁹

La prueba consiste en comparar las varianzas (σ^2) dentro de la muestra (error aleatorio) y entre las muestras (factor controlado), a través de la prueba estadística F, que se calcula de la siguiente manera:

$$F = \frac{\sigma^2 \text{ entre las muestras}}{\sigma^2 \text{ dentro de las muestras}}$$

El valor calculado de F se compara contra el valor crítico $F_{x,y}$, que se encuentra en tablas (donde x = grados de libertad entre muestras, y = grados de libertad dentro de las muestras, ver Tabla 20). Si el valor calculado de F es mayor al crítico, la hipótesis nula adoptada (que se representa como H_0 e indica que no existen variaciones significativas al cambiar el factor fijo) se rechaza, es decir las medias muestrales difieren en forma significativa.

Para realizar los cálculos de Análisis de varianza se utilizó como herramienta la hoja de cálculo Excel (Windows 95, Versión 7); para ello se seleccionan sucesivamente las siguientes funciones: Herramientas/Análisis de datos/Análisis de varianza de un factor, se especifica el intervalo de datos a trabajar y automáticamente aparecen los resultados.

Si no es posible realizar el análisis de varianza de la forma anterior, se pueden utilizar las siguientes fórmulas:⁴⁹

Tabla 20. Fórmulas para realizar el análisis de varianza

Fuente de variación	Varianza	Grados de libertad
Entre muestras	$[n\sum_i(\bar{x}_i - \bar{x})^2]/x$	$x = h - 1$
Dentro de las muestras	$[\sum_i\sum_j(x_{ij} - \bar{x}_i)^2]/y$	$y = h(n-1)$
Total		$v = hn-1$

donde:

\bar{x}_i = media de la i-ésima muestra

\bar{x} = media de todos los valores agrupados

x_{ij} = j-ésima medida de la i-ésima muestra

h = número de tipos de muestras

n = número de elementos de cada tipo de muestra (réplicas)

Dentro del análisis de varianza existe un valor conocido como diferencia mínima significativa (dms), que se utiliza para determinar si las medias difieren significativamente entre sí; cuando esto sucede la diferencia entre dos medias es

superior a dicho valor. Para calcular la diferencia mínima significativa se utiliza la siguiente fórmula: $s(2/n)^{1/2} \cdot t_y$, en donde s es un estimador de σ dentro de las muestras, y t es el valor de la t de Student para y, que son los grados de libertad dentro de las muestras.⁴⁹

b) Resultados del tratamiento estadístico

Se estudió la estabilidad de la disolución durante 38 días, en este intervalo de tiempo se realizaron 8 determinaciones por duplicado

Inicialmente se planteó la siguiente hipótesis nula:

H_0 : El transcurso del tiempo no afecta la estabilidad de la disolución de tiosulfato de sodio

Resultados del análisis de varianza

$F_{calculada}$	$F_{critica}$	P	dms	v
41.84	3.5	1.11×10^{-5}	0.0002	15

P = Probabilidad para aceptar la hipótesis nula

σ^2 entre muestras: 2.46×10^{-7}

σ^2 dentro de muestras: 5.88×10^{-9}

$\sigma_{Titulación} = 7.67 \times 10^{-5}$

dms = diferencia mínima significativa

v = Grados de libertad

Debido a que el valor de F calculado es mayor que el valor crítico, se rechaza la hipótesis nula, además la probabilidad para aceptar la hipótesis nula es muy pequeña. El valor de la diferencia mínima significativa es muy pequeño, por cual existe una probabilidad alta de que se rebase ese valor (ver tabla I-A).

Adicionalmente se calculó el % de variación con respecto al día en que se preparó la disolución, a los 10 días es de 2.31%; éste valor es alto ya que la disolución de tiosulfato de sodio se utiliza como disolución patrón en la titulación de la disolución de fenol, en este caso se podría aceptar una variación del 0.5%; por consiguiente es recomendable realizar la titulación cada vez que se utilice la disolución. Es posible que la estabilidad de la disolución se haya vista afectada por presencia de microorganismos.

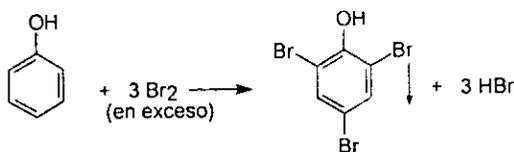
7.2.2 Titulación de la disolución de reserva de fenol

7.2.2.1 Reacciones

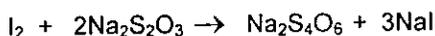
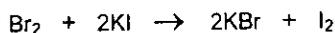
La titulación de la disolución de reserva del fenol se efectuó de acuerdo al método tradicional,^{59,63} para ello es necesario que exista bromo (Br_2) en la

disolución que se produce de la reacción entre los iones bromuro y bromato, en medio ácido. Debe existir un exceso de bromo para asegurar la formación cuantitativa del tribromofenol (precipitado blanco). Posteriormente, se hace reaccionar el bromo libre con yoduro de potasio (KI); de esta reacción se libera yodo (I_2) que se titula con disolución patrón de tiosulfato de sodio, en presencia de disolución de almidón como indicador.

Las reacciones para la titulación del fenol son las siguientes:



Tribromofenol (precipita)



7.2.2.2 Procedimiento experimental

A un matraz que contiene aproximadamente 40 mL de agua se adicionan consecutivamente 20 mL de disolución de reserva de fenol, 16 mL de disolución de bromato-bromuro y 2 mL de ácido clorhídrico concentrado, se tapa y se deja reposar en la oscuridad de 10 a 15 minutos para que se complete la reacción. Posteriormente se adicionan 0.4 g de yoduro de potasio. Finalmente se titula el yodo liberado con la disolución patrón de tiosulfato de sodio, en presencia de disolución de almidón como indicador. Debido a que el tribromofenol es un precipitado, la titulación se debe efectuar con agitación vigorosa, para que las reacciones se lleven a cabo adecuadamente.

Por otra parte, se prepara un blanco que debe contener 20 mL de agua, 4 mL de disolución de bromato/bromuro, 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado, se tapa el matraz y se deja reposar durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se procede a titular con disolución patrón de tiosulfato de sodio, con agitación vigorosa. En los dos casos se registra el volumen gastado de titulante.

7.2.2.3 Resultados

a) Cálculo de la concentración

Las determinaciones se realizaron por triplicado, se calculó el promedio y finalmente se determinó la concentración de fenol en la disolución de reserva con base en lo siguiente:

$$(V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ gastado con el blanco}} \times 4) - V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ gastado con las muestras}} = \text{fenol presente en las muestras}$$

$$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times \frac{\text{y moles de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{1000 \text{ mL de disolución de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times \frac{1 \text{ mol de I}_2}{2 \text{ moles de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times \frac{1 \text{ mol de Br}_2}{1 \text{ mol de I}_2} \times \frac{1 \text{ mol de fenol}}{3 \text{ moles de Br}_2} \times \frac{94.11 \text{ gramos de fenol}}{1 \text{ mol de fenol}} \times \frac{1000 \text{ mg de fenol}}{1 \text{ gramo de fenol}} \times \frac{1}{20 \text{ mL de disolución de fenol}} \times \frac{1}{1000 \text{ mL de disolución de fenol}} = z \text{ mg/L de fenol}$$

Los resultados de las titulaciones se presentan en las Tabla I-B y I-C y en las Gráficas I-B y I-C del Anexo I. Se estudiaron dos disoluciones de fenol. Se realizó el análisis de varianza de los resultados con el fin de definir el intervalo de tiempo en que la disolución puede considerarse como estable.

b) Resultados del tratamiento estadístico

Se planteó la siguiente hipótesis:

H₀: El transcurso del tiempo no afecta la estabilidad de la disolución de reserva de fenol

Estudio # 1

Se estudió la estabilidad de la disolución en un periodo de 92 días, durante el cual se realizaron 12 determinaciones.

Resultados del análisis de varianza

F _{calculada}	F _{crítica}	P	dms	v
15.06	2.22	3.29x10 ⁻⁸	7.01	35

σ² entre muestras: 261.46

σ² dentro de muestras: 17.36

σ Titulación = 4.16

Se rechaza la hipótesis nula, por lo cual, el transcurso del tiempo es una variable que afecta la concentración de la disolución de reserva de fenol. De acuerdo a la tabla I-B (Anexo I), sólo para el primer día posterior a la preparación de la muestra, la diferencia mínima significativa no se ve rebasada.

Si se consideran los % de variación con respecto al día de preparación de la disolución el valor máximo es de 2.81%; esta variación se considera elevada, ya que el fenol se utiliza como disolución patrón para las curvas de calibración. Se puede concluir que la disolución es estable únicamente durante el día posterior a su preparación.

Estudio # 2

El estudio tuvo una duración de 190 días, dentro de este periodo de tiempo únicamente se realizaron 3 determinaciones.

Resultados del análisis de varianza

F calculada	F crítica	P	dms	v
0.55	5.14	0.60	8.75	8

σ^2 entre muestras: 10.49

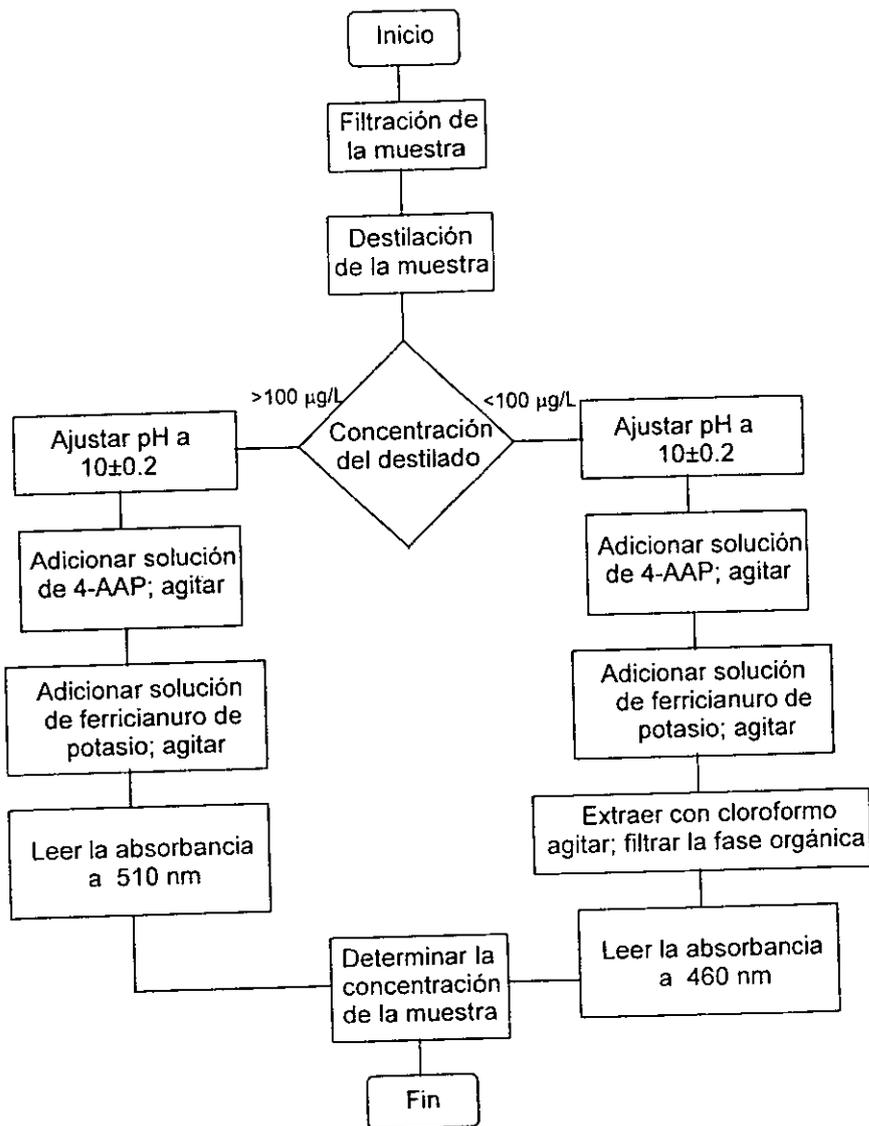
σ^2 dentro de muestras: 19.11

σ Titulación = 4.37

En este caso se acepta la hipótesis nula con una probabilidad más o menos aceptable. En ningún momento se rebasa la hipótesis nula, y los % de variación son muy pequeños (ver tabla I-C, Anexo I), siendo el máximo de 0.37%, por lo que en un inicio se podría considerar que la disolución es estable durante el tiempo de estudio, y que no es necesario realizar la titulación cada vez que se utilice la disolución; sin embargo, se debe tomar en cuenta que durante el intervalo de tiempo que duró estudio se realizaron únicamente tres determinaciones, que no son suficientes para poner en evidencia que la disolución es estable.

7.3 Método espectrofotométrico de la 4-aminoantipirina para la determinación de fenoles

7.3.1 Diagrama de flujo



7.3.2 Método con extracción

7.3.2.1 Curvas de calibración

Se prepararon 500 mL de disoluciones estándar con concentración de fenol de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppb. Posteriormente se adicionaron 10 mL de disolución de cloruro de amonio al 5%, el pH se ajustó a 10 ± 0.2 con pequeñas adiciones de hidróxido de amonio concentrado, se adicionaron 3 mL de disolución de 4-aminoantipirina al 2% y 3 mL de disolución de ferricianuro de potasio al 8%.

Después de cada adición se agitó con el propósito de homogenizar, se dejaron transcurrir aproximadamente 10 minutos para que se desarrollara el compuesto colorido. La disolución se transfirió a un embudo de separación de 1 L, se adicionaron 25 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante aproximadamente 2 minutos; se separaron las fases; la orgánica se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 40, en el cual se colocaron 0.5 gramos de sulfato de sodio anhidro, con el propósito de eliminar el agua de la fase orgánica. Finalmente se leyó la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción, que se obtuvo a través de los espectros de absorción a 457-458 nm. Los resultados se presentan en la tabla III-A del anexo III. Se utilizó el procedimiento propuesto por ASTM D 1783-87;¹¹ sólo se realizó una modificación, en vez de utilizar 5 gramos de sulfato de sodio anhidro, se utilizaron con 0.5 gramos.

Información obtenida a partir de las curvas de calibración

Intervalo lineal

El primer paso fue obtener varias curvas de calibración (tablas III-A, III-B, III-C y III-D en el anexo III), se delimitó el intervalo de linealidad por simple observación y por el coeficiente de correlación de la regresión lineal (tablas III-E, III-F, III-G y III-H).

Linealidad

Dentro del intervalo elegido se eliminaron los puntos que parecían aberrantes, para ello se utilizó la prueba Q de Dixon,⁴⁹ que es una de varias pruebas que se utiliza para eliminar valores aberrantes. La prueba consiste en calcular un valor Q mediante la siguiente relación:

$$Q = \frac{\text{valor sospechoso} - \text{valor más cercano}}{\text{valor más grande} - \text{valor más pequeño}}$$

El valor de Q calculado se compara con el valor crítico, éste se obtiene de tablas estadísticas para ν (grados de libertad), que se calcula al restar una unidad al número total de mediciones. Si el valor calculado supera al valor crítico, se rechaza el valor sospechoso.

Posteriormente se realizó la regresión lineal para obtener los valores de la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r), (Anexo III). También se calculó la desviación estándar para la pendiente (s_m) y la ordenada al origen (s_b), con base en las siguientes fórmulas:⁴⁹

$$s_m = s_{y/x} / \{\sum_i (x_i - \bar{x})^2\}^{1/2}$$

$$s_b = s_{y/x} \{\sum_i x_i^2 / n \sum_i (x_i - \bar{x})^2\}^{1/2}$$

donde:

x_i = representa los diferentes valores de concentración utilizados en la curva
 \bar{x} = es el promedio de todos los valores de concentración

s_{y/x} se calcula con base en la siguiente fórmula:

$$s_{y/x} = \{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2 / (n-2)\}^{1/2}$$

donde:

y_i = representa los diferentes valores de absorbancia obtenidos
 \hat{y}_i = representa los diferentes valores de absorbancia obtenidos a partir de la curva de calibración ajustada

A partir de los valores de s_m y s_b se obtuvieron los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen (tablas III-E, III-F, III-G y III-H, Anexo III), que se expresan de la siguiente forma:

$$m - t_{n-2} s_m < m < m + t_{n-2} s_m \quad \text{y} \quad b - t_{n-2} s_b < b < b + t_{n-2} s_b$$

donde:

t_{n-2} = t de Student para n-2 grados de libertad, siendo n el número de puntos de la curva

A partir del intervalo de confianza de la ordenada al origen se determinó si el punto (0,0) formaba parte de la población de los puntos, en el caso de ser verdadero éste se incluyó dentro de los puntos de la curva, y se recalcularon los valores de m, b y r. Esto se dió para todas las curvas del método de la 4-AAP con extracción (C/E), para las curvas 1, 2, 3, 4 y 5 del método 4-AAP sin extracción (S/E), para las curvas 1, 3, 5, 6 y 7 del método del MBTH C/E y curva 2 del método MBTH S/E.

Para evaluar qué curvas pertenecían a una misma población se realizó la regresión con y sin las curvas cuya pendiente aparentemente era diferente a las demás, si con esto aumentaba el coeficiente de correlación se eliminaba dicha curva; para ningún método fue necesario que se eliminara alguna curva.

Finalmente se promediaron los valores de absorbancia para cada valor de concentración de fenol y se obtuvo una curva representativa para cada método, ver Tabla III-I y Gráficas III-1, III-2, III-3 y III-4, Anexo III.

Longitud de onda de máxima absorción

La determinación de la longitud de onda de máxima absorción se llevó a cabo antes de realizar las curvas de calibración. Se obtuvieron varios espectros con el estándar de concentración intermedio, entre los preparados para cada curva (ver espectros en Anexo II), se informa el valor o el intervalo de valores que aparecieron con mayor frecuencia.

Absortividad molar (ϵ)

Este valor se calculó a partir de la curva de calibración representativa para cada método, de acuerdo a la ecuación de la Ley de Lambert-Beer ($A=\epsilon bc$).

Límite de detección y Límite de cuantificación

Existen diferentes métodos de cálculo para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación, es por ello que es de gran importancia que cuando se cite un valor en un trabajo se proporcione indique el método de cálculo utilizado. En el presente trabajo se utilizaron dos métodos de cálculo, el Método A y el Método B^c:

Método A

Límite de detección: es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco s_B .

Según Miller, el valor de b (ordenada al origen) puede utilizarse como una estimación de y_B , para s_B se puede utilizar $s_{y/x}$ (definido anteriormente), de esta manera se calcula $b + 3 s_{y/x}$, y posteriormente se expresa en unidades de concentración.

Límite de cuantificación: se considera como el límite de concentración más bajo con el que se pueden realizar mediciones cuantitativas con precisión.

Miller recomienda que se exprese como el valor de $b + 10s_{y/x}$.

Para realizar los cálculos se utilizaron las curvas representativa obtenidas para cada método.

^c El método A se refiere al sugerido por Miller en el libro Estadística para Química Analítica⁴⁹ y el método B es el recomendado por la norma ASTM E 876-89.¹⁹

Método B

Límite de detección: Es la concentración estimada más baja que permite determinar con un grado de confiabilidad definido si un elemento se encuentra presente.¹⁹

$$L. D. = mts$$

donde:

m = es la pendiente de la recta concentración en función del promedio de las lecturas para cada concentración.

t = es el valor de la t de Student para # total de mediciones - # de concentraciones (valor dado para una cola)

n = es el número de curvas realizadas

s = La desviación estándar global estimada a partir de las curvas de calibración dadas y se calcula obteniendo la raíz cuadrada de s^2 que está dada por:

$$s^2 = \{\sum(x_i^2) - [(\sum x_1)^2/n_1 + (\sum x_2)^2/n_2 + \dots + (\sum x_k)^2/n_k]\} / (N-k)$$

donde:

x_i = representa todas las lecturas

N = total de mediciones

k = número de grupos

(cada grupo representa una concentración dada)

n = número de mediciones en cada grupo o número de curvas de calibración

Límite de cuantificación: es la concentración estimada más baja que se puede determinar con un grado de confiabilidad definido.¹⁹

Se calcula de la siguiente forma:

$$L.C. = (4ts_c)/n^{1/2}$$

t = es el valor de la t de Student para # total de mediciones - # de concentraciones (valor dado para dos colas)

n = es el número de curvas realizadas

s_c = es la desviación estándar de la concentración y se calcula al multiplicar la desviación estándar global (s) por la pendiente (m)

Precisión

La precisión es una medida del grado de concordancia entre los análisis múltiples de una muestra dada.⁴⁸ Se puede evaluar de diferentes formas, mediante análisis de réplicas, análisis repetidos de un estándar estable o análisis de adiciones conocidas sobre las muestras. Se puede utilizar la desviación estándar como un estimador de la precisión.

Para obtener la precisión global de cada método se consideraron resultados que se habían obtenido por duplicado en los diferentes estudios realizados y los que se obtuvieron bajo condiciones idénticas a los estándares de las curvas de calibración; aunque en diferentes días. En esta evaluación se incluyen errores implicados en la preparación y análisis de muestras, el error del operador, la variación del resultado con respecto al día del análisis.

Cuando se efectúan determinaciones por duplicado, la amplitud de resultados, R , es tan eficaz como la desviación estándar, ya que las dos medidas difieren en una constante ($1.128s = R$).⁴⁸ La amplitud se calcula al dividir la suma de todas las diferencias (valores absolutos) entre el número de observaciones $R = \sum d_i/n$. La desviación estándar (s), que representa la precisión, se obtiene al dividir R por 1.128.

Los datos y cálculos de la precisión se encuentran en el Anexo V. La precisión obtenida para cada estudio es la precisión para un mismo operador - con el mismo equipo - operando diferente día.¹⁴

Es importante mencionar que tiene sentido calcular la precisión de un método siempre y cuando el procedimiento está en condiciones de control estadístico,¹⁴ esto se conoce al realizar gráficos de control.^{14,48,49} En el presente trabajo no se realizaron; sin embargo, se espera que los valores obtenidos sean estimadores adecuados de la precisión.

Exactitud

No fue posible calcular la exactitud de cada método debido a que no existen patrones certificados de disoluciones de fenol.⁴⁸

7.3.2.2 Datos obtenidos a partir de las curvas de calibración

- a) Intervalo lineal
0-160 ppb
Intervalo informado: 0-100 ppb⁵⁰

ASTM recomienda que se trabaje con este método hasta 100 ppb.¹¹ Las curvas 1-4 se trabajaron hasta este valor y se observó un comportamiento lineal. La curva 5 se trabajó hasta 160 ppb y también se observó linealidad ($m=0.0043$, 0.0238 y $r=0.9991$). No se descarta la posibilidad de que el comportamiento sea lineal para concentraciones superiores.

- b) Linealidad
Resultados de la regresión lineal de la curva representativa:
Pendiente = $0.0043 \pm 0.0001 \text{ ppb}^{-1}$
Ordenada al origen = -0.0120 ± 0.0082
Coeficiente de correlación = 0.9997

Los resultados son muy aceptables, a pesar de que éste fue el primer método con el que se trabajó.

- c) Longitud de onda de máxima absorción
457-458 nm (ver Espectro 1, Anexo II)
Valor informado: 460 nm¹¹

En realidad el intervalo de longitud de onda no difiere mucho del informado.

- d) Valor de absortividad molar
15048 cm⁻¹mol⁻¹L
No se encontró algún valor mencionado en la literatura.

- e) Límite de detección
Método A = 2.69 ppb
Método B = 12.85 ppb
Valor informado: 2 ppb, para método automatizado³⁷

El valor calculado por el método A es muy cercano al informado; sin embargo, se debe considerar que existe una influencia en la forma en la que se realiza el análisis, por lo que no es muy adecuado comparar rigurosamente.

- f) Límite de cuantificación
Método A = 8.97 ppb
Método B = 27.63 ppb

No se encontraron valores informados en la literatura.

Resulta evidente que tanto para el límite de detección, como para el límite de cuantificación, existen diferencias significativas con respecto al método de cálculo que se utilizó.

- g) Precisión
2.41%

En un intervalo de concentración estudiado de 84.30 a 118.27 ppb, con 14 determinaciones por duplicado.

- Valores informados:
3.6%, 5 ppb, 11 determinaciones por duplicado³⁷
3.3%, 18-75 ppb⁵⁰

El resultado obtenido es muy aceptable ya que supera al valor informado, aunque debe considerarse que éstos últimos se calcularon para concentraciones menores y para las que es más probable que se tenga una no muy buena precisión.

7.3.2.3 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Se prepararon muestras sintéticas de concentración de fenol de 100 ppb por triplicado, se realizaron lecturas de absorbancia a diferentes tiempos. Se trabajó con tubos HACH® con tapón, para impedir la evaporación, se guardaron las muestras para no ser expuestas a la luz en los momentos en que no se realizaron las lecturas de absorbancia.

Inicialmente se planteó la siguiente hipótesis nula:

H_0 = El transcurso del tiempo no afecta la estabilidad del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F_{calc}	$F_{critica}$	dms	P	v
1. Muestra (a)	24.4	4.06	0.0040	2.2×10^{-4}	11
2. Muestra (b)	1.75	2.66	0.0140	1.6×10^{-1}	23
3. Blanco	160.3	3.11	0.0040	1.48×10^{-10}	17

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de las muestras

Los resultados se encuentran en las tablas A-1, A-2 y A-3, Anexo IV.

1. Este estudio inició a partir de 2.67 horas transcurridas después de la preparación del compuesto colorido; y es hasta 4.97 horas donde éste es estable. Posteriormente (a las 26.92 horas), hay un aumento significativo en la absorbancia, tal vez provocado por una posible evaporación del disolvente, por consiguiente se rebasa la dms.
2. La muestra fue estable durante el tiempo de duración del estudio (23.17 h).
3. La dms se supera desde la primera lectura, esto se debe a que existen errores al trabajar con tubos HACH®, ya que hay repetibilidad en las lecturas.

La muestra que se lee contra el blanco es estable durante un intervalo de tiempo grande; sin embargo, se debe considerar que con el transcurso del tiempo también hay variaciones en la absorbancia del blanco y de la muestra, por un deterioro ocasionado con el transcurso del tiempo o por una evaporación del disolvente. El compuesto colorido es estable hasta 4.97 horas posteriores a la preparación de la muestra, esto supera el valor informado de 3 horas.³⁰

7.3.2.4 Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido

Se prepararon muestras sintéticas de concentración de fenol de 100 ppb por triplicado, se realizaron lecturas de absorbancia a 10, 15, 23, 30 y 35°C. Se utilizaron tubos HACH® provistos de un tapón con el propósito de evitar en lo posible la evaporación del disolvente; se trabajó con baño maría para llevar a las muestras a los diferentes valores de temperatura.

H_0 = Las variaciones de temperatura no afectan el desarrollo del compuesto colorido.

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
Muestra (b)	4.68	3.48	0.0192	0.0217	14

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de las muestras

Existen diferencias entre 10 y 30°C, y entre 10 y 35°C (ver tabla A-4, Anexo IV). La dms casi se rebasa al comparar los valores para 23 y 30°C (diferencia de 0.016). Con base en estos resultados, se puede decir que la temperatura no tiene efecto en el desarrollo del color, en el intervalo de temperatura que abarca de 15 a 30°C; este intervalo se encuentra a valores inferiores comparado con el informado en la literatura 19-37°C.⁵³

Si se realizan comparaciones tomando como referencia la temperatura de 23°C, se observa una disminución en la absorbancia a temperaturas mayores y un aumento en absorbancia a temperaturas menores.

7.3.2.5 Estudio del efecto de la variación del pH en el desarrollo del compuesto colorido

Este estudio se realizó únicamente con el método de la 4-AAP; ya que, según la literatura consultada, existen variaciones en este método cuando se trabaja a diferentes valores de pH,³² mientras que por otra parte se ha indicado que esto no sucede con el método del MBTH.³⁷ Se calibró el equipo medidor de pH con las disoluciones amortiguadoras; se prepararon muestras sintéticas de concentración de fenol de 100 ppb a diferentes valores de pH (4.7, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0 y 11.5).

Inicialmente se planteó la siguiente hipótesis nula:

H_0 = Las variaciones de pH no afectan el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	Dms	P	v
Muestra (b)	907.26	2.39	0.0133	4.12×10^{-24}	29

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de las muestras

Se rechaza la hipótesis nula, esto significa que las variaciones del pH influyen en el desarrollo del compuesto colorido. Se calculó la diferencia entre el promedio de cada valor de pH con el de la muestra de pH 10.0, y se encontró que la dms no se supera en el intervalo de pH de 8.5 a 10, (ver tabla A-5, Anexo IV), éste sería entonces el intervalo de pH en el que se puede trabajar sin que existan variaciones significativas. Este intervalo se encuentra a valores menores de pH con respecto a los informados en la literatura, que son 9-10.7⁵³ y 10.3-10.5;⁵⁹ además es más amplio el valor encontrado si se compara con el último de los informados.

Además se observó, que a pH 8.0 es cuando se favorece la formación del compuesto colorido, ya que la absorbancia es mayor si se compara con las otras muestras; esto concuerda con la literatura ya revisada.³² A valores de pH inferiores a 8 y superiores a 10 se observa una disminución en la absorbancia.

7.3.2.6 Estudio del efecto de la variación en la concentración de 4-AAP en el desarrollo del compuesto colorido

Se trabajó con concentraciones de 4-aminoantipirina de 0.5, 2 y 5% y con muestras de concentración de fenol de 20, 50 y 150 ppb.

Hipótesis nula:

H_0 = La variación en la concentración de 4-AAP no afecta el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
1. Muestra I-a	420	5.14	0.0069	3.55×10^{-7}	8
2. Muestra I-b	1412	5.14	0.0070	9.51×10^{-9}	8
3. Muestra II-a	600	5.14	0.0064	1.22×10^{-7}	8
4. Muestra II-b	1711	5.14	0.0061	5.36×10^{-9}	8
5. Muestra III-a	2789	5.14	0.0051	1.24×10^{-9}	8
6. Muestra III-b	12375	5.14	0.0032	1.42×10^{-11}	8
7. Blanco	226	5.14	0.0061	2.24×10^{-6}	8

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

Muestra I: tiene una concentración de fenol de 20 ppb

Muestra II: tiene una concentración de fenol de 50 ppb

Muestra III: tiene una concentración de fenol de 150 ppb

El blanco se lee contra cloroformo

De acuerdo a los valores de la F calculada y a la probabilidad para aceptar la hipótesis nula, en todos los estudios se rechaza ésta; esto significa que la variación en la concentración de 4-AAP influye en el desarrollo del color.

Con base en los resultados obtenidos (ver tabla A-6 en Anexo IV), se puede observar que al variar de una concentración de 4-AAP de 0.5% a 2% aumenta la absorbancia. Se podría esperar que con una concentración de 5% la absorbancia fuera superior; sin embargo, esto no sucede, ya que la absorbancia es ligeramente menor con respecto a la obtenida con disolución de 4-AAP al 2%. No se tiene una explicación de lo observado.

Si se comparan los promedios de las mediciones con la diferencia mínima significativa dentro de cada estudio, ésta se rebasa en todos los casos, a excepción del estudio 4 en donde no existen diferencias entre las disoluciones que se trabajaron con 4-AAP al 2 y 5%.

Es más conveniente trabajar con disolución de 4-aminoantipirina de concentración 2%, ya que se obtiene un máximo desarrollo del compuesto colorido; esto coincide con el valor indicado en el protocolo de la ASTM.¹¹

La disolución se preparó en cada análisis; sin embargo, se puede preparar una cantidad mayor y guardar en refrigeración por varias semanas e incluso meses.^{1,54}

7.3.2.7 Estudio del efecto de la variación en la concentración de $K_3Fe(CN)_6$ en el desarrollo del compuesto colorido

Se trabajó con tres concentraciones diferentes de fenol (20, 50 y 150 ppb); el estudio se realizó por triplicado, con variaciones en la concentración de $K_3Fe(CN)_6$ (4, 8 y 12%).

Hipótesis nula:

H_0 = La variación en la concentración de ferricianuro de potasio no afecta el desarrollo del compuesto colorido.

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{crítica}}$	dms	P	v
1. Muestra I-a	164	9.55	0.0074	8.6×10^{-4}	5
2. Muestra I-b	25	9.55	0.0136	1.3×10^{-2}	5
3. Muestra II-a	26	9.55	0.0566	1.3×10^{-2}	5
4. Muestra II-b	21	9.55	0.0598	1.7×10^{-2}	5
5. Muestra III-a	89	9.55	0.0469	2.1×10^{-3}	5
6. Muestra III-b	156	9.55	0.0317	9.3×10^{-4}	5
7. Blanco	5.13	5.14	0.0095	5.0×10^{-2}	8

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

Muestra I: tiene una concentración de fenol de 20 ppb

Muestra II: tiene una concentración de fenol de 50 ppb

Muestra III: tiene una concentración de fenol de 150 ppb

El blanco se lee contra cloroformo

Se observó un aumento en la absorbancia en las muestras y en el blanco con el incremento de la concentración de ferricianuro de potasio (ver tabla A-7, Anexo IV).

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que se rechaza la hipótesis nula en todos los casos; aunque en el estudio 7 la F calculada es inferior y prácticamente igual a la crítica, también se rechaza la hipótesis nula, ya que la probabilidad para aceptarla es muy pequeña.

Para todos los estudios, a excepción del 6, la dms no se ve rebasada cuando se comparan los resultados obtenidos con concentraciones de ferricianuro de potasio de 8 y 12 %; adicionalmente para el estudio 7 tampoco existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con concentraciones de ferricianuro de potasio de 4 y 8%.

A partir de estos resultados se puede concluir que no existen evidencias de variaciones significativas en los resultados utilizando disoluciones de oxidante de 8 ó 12%. El valor recomendado es de 8%¹¹ y conviene trabajar con éste y no con 12%, con el propósito de ahorrar reactivo. Sin embargo, si en un momento dado se adiciona un exceso, intencionalmente o no, se espera que no influya significativamente en los resultados.³⁰

7.3.2.8 Determinación del porcentaje de recuperación de fenol en muestras sintéticas

Se destilaron 450 mL de muestra, se dejó enfriar, para posteriormente adicionar 50 mL de agua purificada al matraz, finalmente se dejó completar el volumen de destilado a 500 mL. Se adicionaron los demás reactivos para desarrollar el compuesto colorido, de acuerdo a la metodología ya descrita.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{concentración obtenida}}{\text{concentración esperada}} \times 100$$

Resultados:

Determinación	Porcentaje de recuperación (%)
1	95.59
2	102.48
3	98.87
Promedio:	98.98 %

El valor obtenido es muy aceptable, ya que indica que un 98.98% del fenol ha sido recuperado después de la destilación. No se encontraron valores informados en la literatura para comparar con nuestro valor.

7.3.2.9 Determinación del porcentaje de recuperación de fenol en muestras reales

Las muestras con aspecto turbio se filtraron con papel filtro 3B Advantec de 7 cm de diámetro, posteriormente se les adicionó una porción de disolución de fenol. Se destilaron las muestras y se desarrolló el compuesto colorido; por otra parte se trabajó con dos muestras testigos, una residual pero sin adición de fenol, y una muestra sintética que no se destiló, se desarrolló el compuesto colorido de la forma ya descrita.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{CO}{CT} \times 100$$

donde:

CM = concentración de la muestra

CA = concentración de la adición

CT = concentración total esperada

CO = concentración obtenida de la muestra adicionada

CT = CM + CA

Resultados:

Determinación	Porcentaje de recuperación (%)
1	99.3
2	88.1
3	89.1
4	89.2
Promedio:	91.4 %

Las determinaciones se realizaron con porciones de la misma muestra. Cabe aclarar que el valor obtenido depende del tipo de muestra, por lo cual no se

pueden realizar comparaciones estrictas con valores informados en la literatura; se han informado valores para muestras reales de 78, 97 y 98 %.³⁰

7.3.3 Método sin extracción

7.3.3.1 Curvas de calibración

Se prepararon estándares de 100 mL de volumen con las siguientes concentraciones de fenol: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 15 ppm, para el blanco se utilizó agua purificada. Posteriormente, tanto a los estándares como al blanco, se les adicionaron 2 mL de disolución de NH_4Cl , el pH se ajustó a 10 ± 0.2 con pequeñas adiciones de amoníaco concentrado, se adicionaron 2 mL de disolución de 4-aminoantipirina y 2 mL de disolución de ferricianuro de potasio, después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 506 nm. Los resultados se encuentran en la tabla III-B. El procedimiento se realizó de acuerdo a ASTM D 1783-87.¹¹

7.3.3.2 Datos obtenidos de las curvas de calibración

a) Intervalo lineal

0-15 ppm

Intervalo informado: 0.1-2 ppm⁵⁰

El estándar más concentrado con el que se trabajó fue el de 15 ppm; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el comportamiento sea lineal para concentraciones superiores, el intervalo encontrado es muy superior al informado.

b) Linealidad

Resultados de la regresión lineal:

Pendiente = $0.1339 \pm 0.0010 \text{ ppm}^{-1}$

Ordenada al origen = 0.0029 ± 0.0082

Coefficiente de correlación = 0.9999

Por simple inspección de la curva de calibración (Anexo III) y del coeficiente de correlación se concluye que el método tiene una linealidad aceptable.

c) Longitud de onda de máxima absorción

506 nm (ver Espectro 2, Anexo II)

Valor informado: 510 nm¹¹

El valor encontrado no es muy diferente al informado, todas las curvas de calibración y las lecturas de absorbancia se obtuvieron a la longitud de onda de 506 nm.

d) Valor de absorptividad molar
 $12599 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$
Valor informado: $14000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ³³

El valor calculado es muy aceptable y se acerca al informado, las causas de la diferencia entre dichos valores pueden ser, entre otras, la pureza de los reactivos utilizados, cambios de temperatura, pH, forma de trabajo, equipo utilizado y concentración de reactivos.

e) Límite de detección
Método A = 0.13 ppm
Método B = 0.21 ppm
No se encontraron valores informados.

f) Límite de cuantificación
Método A = 0.43 ppm
Método B = 0.29 ppm
No se encontraron valores informados.
En los dos casos se observan diferencias con el método de cálculo utilizado.

g) Precisión
0.24%
Intervalo de concentración estudiado: 5.03 - 8.25 ppm, con 10 determinaciones por duplicado.
Valor informado: 1.81%, 0.49-1.93ppm⁵⁰

El valor informado es mayor, muy probablemente porque se ha calculado en un intervalo de concentración más bajo, en el cual es más factible tener errores.

7.3.3.3 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Hipótesis nula:

H_0 = El transcurso del tiempo no afecta la estabilidad del compuesto colorido

Se estudió la estabilidad de las muestras durante un intervalo de tiempo de 7.5 horas con muestras de concentración de fenol de 5 ppm. El experimento se realizó por quintuplicado en el caso de las muestras, para el blanco fue por triplicado. Se utilizaron tubos HACH® para tener un mejor control, se guardaron las muestras para no ser expuestas a la luz en los momentos en que no se realizaron las lecturas.

Resultados de análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
1. Muestra (a)	25.86	2.21	0.0231	1.01×10^{-12}	44
2. Muestra (b)	28.30	2.21	0.0229	2.59×10^{-13}	44
3. Blanco	2.14	2.51	0.0030	8.5×10^{-2}	26

a= se refiere a las lecturas realizadas contra agua purificada como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de las muestras

A medida que transcurre el tiempo la absorbancia de las muestras disminuye por lo que no es posible aceptar la hipótesis nula; ya que en los dos casos la F calculada rebasa el valor de la crítica. Con respecto al blanco esto no sucede; sin embargo, la posibilidad de aceptar la hipótesis nula es muy pequeña.

En el caso de los estudios 1 y 2 hay estabilidad hasta 1.5 horas, a tiempos posteriores se rebasa la dms (ver tablas B-1 y B-2 en Anexo IV), con respecto al blanco la estabilidad es de 6 horas (ver tabla B-3 en Anexo IV).

Con base en los resultados anteriores se puede concluir que aunque el blanco sea estable por más tiempo, las muestras deberán leerse en un intervalo de tiempo posterior a su preparación no mayor que 1.5 horas; este valor es inferior al máximo informado que es de 3.17 horas.⁴⁵

7.3.3.4 Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido

El estudio se realizó por triplicado con muestras de fenol de concentración de 5 ppm, se trabajó con los siguientes valores de temperatura: 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C.

Hipótesis nula:

H₀ = Las variaciones de temperatura no afectan el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
Muestra (b)	0.44	3.11	0.0138	0.8118	17

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de las muestras.

Se puede aceptar la hipótesis nula con una probabilidad muy cercana a la unidad. Con respecto a la diferencia mínima significativa, si se compara con los promedios de los valores de absorbancia obtenidos para cada temperatura, no se supera en ningún caso (Ver tabla B-4 en Anexo IV). En el intervalo de temperatura estudiado, no se ha puesto en evidencia que este factor influye sobre el desarrollo del compuesto colorido.

7.3.3.5 Estudio del efecto de la variación del pH en el desarrollo del compuesto colorido

Planteamiento de la hipótesis nula

H_0 = Las variaciones de pH no afectan el desarrollo del compuesto colorido

Se prepararon muestras sintéticas de concentración de fenol de 5 ppm a diferentes valores de pH (5.64, 7.05, 8.12, 9.05, 9.50, 9.80, 10.00, 10.20, 10.50, 11.00 y 11.75).

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
Muestra (b)	523.20	2.30	0.0176	9.32×10^{-24}	32

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de las muestras

Se rechaza la hipótesis nula, esto significa que las variaciones del pH influyen en el desarrollo del compuesto colorido. Sin embargo, al comparar los promedios de las demás mediciones con el de la muestra de pH 10 (ver tabla B-5) la dms no se rebasa en el intervalo de pH comprendido entre 9.05 y 10.5; esto coincide con los valores informados, 9-10.7.⁵³ A un valor de pH de 8.12 es cuando se obtiene un valor de absorbancia mayor³¹ y a valores inferiores la absorbancia disminuye, así también para valores de pH superiores a pH 10.5.

7.3.3.6 Estudio del efecto de la variación en la concentración de 4-AAP en el desarrollo del compuesto colorido

Se trabajó por triplicado, con diferente concentración de fenol (2, 5 y 10 ppm) y con concentración de 4-AAP de 0.5, 2 y 5%.

Planteamiento de la hipótesis nula

H_0 = La variación en la concentración de 4-AAP no afecta el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
1. Muestra I-a	33.99	5.14	0.0057	5.3×10^{-4}	8
2. Muestra I-b	56.22	5.14	0.0070	1.3×10^{-4}	8
3. Muestra II-a	1138	5.14	0.0038	1.82×10^{-8}	8
4. Muestra II-b	1638	5.14	0.0028	6.11×10^{-9}	8
5. Muestra III-a	27932	5.14	0.0024	1.24×10^{-12}	8
6. Muestra III-b	5782	5.14	0.0048	1.40×10^{-10}	8
7. Blanco	219	5.14	0.0014	2.45×10^{-6}	8

a= se refiere a las lecturas realizadas contra agua destilada como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

El blanco se leyó contra agua destilada

De acuerdo a los valores de F calculados y a la probabilidad para aceptar la hipótesis nula, en todos los casos se rechaza esta última; esto significa que la variación en la concentración de 4-AAP tiene un efecto en el desarrollo del color. Como se puede observar en la tabla B-6 (anexo IV), prácticamente en todos los estudios, la absorbancia aumenta cuando se trabaja con disoluciones de 4-AAP más concentradas.

La dms se rebasa en todos los estudios, a excepción del estudio 3 en donde no existe diferencia entre los resultados para concentraciones de 4-AAP de 2 y 5%. Para ahorrar reactivo es conveniente trabajar con una concentración de 2% como se ha recomendado en la literatura;¹¹ sin embargo, si en un momento dado se adiciona un exceso de 4-AAP no se esperan variaciones significativas en los resultados.

7.3.3.7 Estudio del efecto de la variación en la concentración de $K_3Fe(CN)_6$ en el desarrollo del compuesto colorido

Se trabajó con concentraciones de $K_3Fe(CN)_6$ de 4, 8 y 12 %. Se trabajó por triplicado, con tres concentraciones diferentes de fenol (2, 5 y 10 ppm).

Planteamiento de la hipótesis nula:

H_0 = La variación en la concentración de ferricianuro de potasio no afecta el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
1. Muestra I-a	186	5.14	0.0110	3.97×10^{-6}	8
2. Muestra I-b	191	5.14	0.0102	3.72×10^{-6}	8
3. Muestra II-a	1368	5.14	0.0222	1.05×10^{-8}	8
4. Muestra II-b	1211	5.14	0.0224	1.51×10^{-8}	8
5. Muestra III-a	268	5.14	0.0607	1.35×10^{-6}	8
6. Muestra III-b	279	5.14	0.0576	1.19×10^{-6}	8
7. Blanco	0.40	5.14	0.0007	6.80×10^{-1}	8

a= se refiere a las lecturas realizadas contra agua destilada como blanco.

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra.

El blanco se leyó contra agua destilada

A excepción del estudio 7, no se puede aceptar la hipótesis nula, por consiguiente se puede deducir que existe un efecto en el compuesto colorido con la variación de oxidante. Como se puede observar en la tabla B-7 del Anexo IV la absorbancia aumenta al pasar de una concentración de ferricianuro de potasio de 4 a 8%, en el caso de 8 y 12% de oxidante no existen variaciones significativas. Si se comparan los promedios dentro de cada estudio con la diferencia mínima

significativa, se puede deducir que los seis primeros estudios no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos con concentraciones de ferricianuro de potasio de 8 y 12%, con respecto al blanco no hay ningún caso en el que se rebase la dms.

7.3.3.8 Determinación del porcentaje de recuperación de fenol en muestras sintéticas

Se destilaron 90 mL de la muestra, se dejó enfriar, se adicionaron 10 mL de agua, se completó la destilación, por otra parte se preparó una muestra testigo que no se destila. Se trataron las muestras de la misma forma que los estándares.

Resultados:

Determinación	Porcentaje de recuperación (%)
1	95.87
2	97.82
3	96.60
4	97.55
Promedio:	<u>96.96%</u>

Los resultados son aceptables ya que el 96.96% de fenol se logra recuperar en la destilación. No se encontraron valores informados en la literatura para efectuar comparaciones.

7.3.3.9 Determinación del porcentaje de recuperación de fenol en muestras reales

Se filtraron las muestras que presentaron un aspecto turbio, posteriormente se les adicionó una cantidad de disolución de fenol, se destiló y se adicionaron los reactivos para desarrollar el compuesto colorido, como en el caso anterior. Por otra parte, se trabajó con dos muestras testigos, una muestra de agua residual pero sin adición de fenol, y una muestra sintética que no se destilaba.

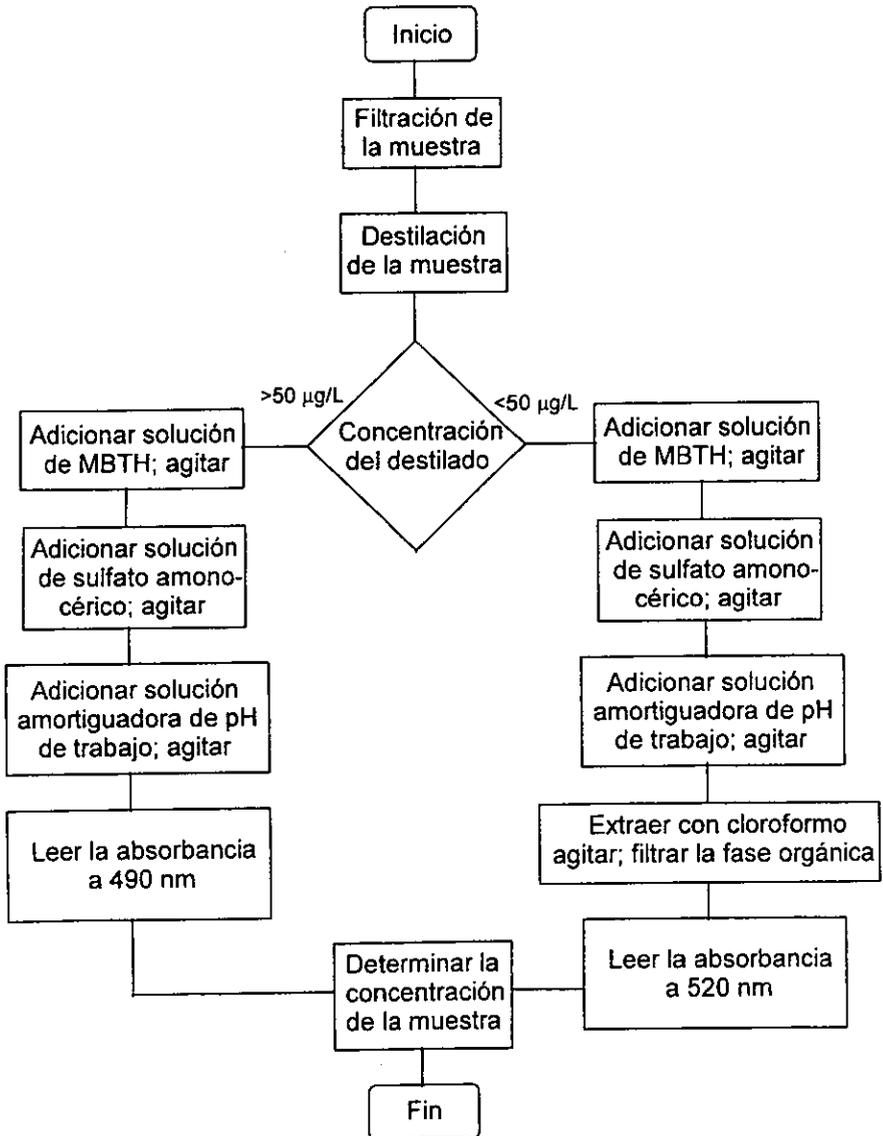
Resultados:

Determinación	Porcentaje de recuperación (%)
1	92.1
2	61.0

En este caso las determinaciones se realizaron con muestras distintas, por lo cual no es adecuado calcular un promedio. En el primer caso el % de recuperación es muy satisfactorio, en el segundo no; esto se debe a la diferencia en composición de las muestras. No se encontraron valores informados en la literatura para efectuar comparaciones.

7.4 Método espectrofotométrico del MBTH

7.4.1 Diagrama de flujo



7.4.2 Método con extracción

7.4.2.1 Curvas de calibración

Se prepararon estándares de 500 mL con las siguientes concentraciones de fenol: 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ppb. Posteriormente se adicionaron 4 mL de disolución de MBTH al 0.05%, se agitó, e inmediatamente se adicionaron 2.5 mL de disolución de sulfato amonocérico al 1%, se agitó durante aproximadamente 2 minutos. Después se adicionaron 7 mL de disolución amortiguadora de trabajo; finalmente, se agitó durante 10 minutos para permitir el desarrollo del compuesto colorido. Posteriormente se realizó una extracción con cloroformo de manera similar que con el método de la 4-AAP; debido a que durante la extracción se formó una emulsión se adicionó una pequeña cantidad de cloruro de sodio. Finalmente se leyó la absorbancia 489-490 nm. El procedimiento se realizó de acuerdo a Method 9067 A-Phenolics-Spectrophotometric, MBTH with distillation.³⁰

7.4.2.2 Datos obtenidos de las curvas de calibración

a) Intervalo lineal
0-60 ppb

Para concentraciones superiores a 60 ppb el comportamiento de la curva deja de ser lineal, con esto se puede explicar el por qué la literatura recomienda un intervalo de trabajo que no rebase 50 ppb.³⁰

b) Linealidad
Resultados de la regresión lineal:
Pendiente = $0.0044 \pm 0.0002 \text{ ppb}^{-1}$
Ordenada al origen = 0.0094 ± 0.0075
Coeficiente de correlación = 0.9992

Con base en el coeficiente de correlación y la curva de calibración (Anexo III), se puede concluir que el método tiene una buena linealidad en el intervalo examinado.

c) Longitud de onda de máxima absorción
489-490 nm

El intervalo obtenido no difiere significativamente del valor informado, 490.³⁰

d) Valor de absortividad molar
 $17668 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$

No se encontró un valor informado en la literatura.

e) Límite de detección
Método A = 2.77 ppb
Método B = 4.22 ppb

Valores informados:
 2 ppb para el método automatizado³⁷
 1 ppb para el método manual³⁴

Si se compara el valor informado para el método manual, éste es menor al obtenido por los métodos de cálculo A y B. Se debe considerar que el valor de límite de detección varía con el método de cálculo, en la literatura no se informa qué método se utilizó.

f) Límite de cuantificación

Método A = 9.25 ppb

Método B = 7.67 ppb

No se encontraron valores informados en la literatura.

g) Precisión

0.42%

Intervalo de concentración estudiado: 36.97 - 46.33 ppb

Se realizaron 15 determinaciones por duplicado

Valor informado:

2.4%

Concentración: 5 ppb, 11 determinaciones por duplicado³⁷

El valor informado es superior al calculado muy probablemente por el nivel de concentración utilizado.

7.4.2.3 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Se trabajó con muestras de fenol de concentración 40 ppb por triplicado, las muestras se monitorearon durante aproximadamente 25 horas. El blanco se monitoreó a partir de las 3.75 horas. Se utilizaron tubos HACH® para realizar las lecturas, las muestras se guardaron para no ser expuestas a la luz en los momentos en que no se realizaron lecturas.

Planteamiento de la hipótesis nula:

H_0 = El transcurso del tiempo no afecta la estabilidad del compuesto colorido

Resultados de análisis de varianza

Tipo de estudio	F_{calc}	$F_{critica}$	dms	P	v
1.Muestra (a)	0.20	2.30	0.0780	0.99	32
2.Muestra (b)	0.38	2.30	0.0760	0.94	32
3.Blanco	1.12	4.07	0.0470	0.40	11

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

El blanco se leyó contra cloroformo

Tanto para el estudio 1 como para el 2 se acepta la hipótesis nula con una probabilidad muy cercana a 1, por consiguiente el transcurso del tiempo no influye en el desarrollo del compuesto colorido. Se puede concluir que las muestras son estables durante las 25.25 horas que duró el estudio. En el caso del blanco, también se acepta la hipótesis nula, aunque con una probabilidad menor y se puede concluir que también es estable durante el mismo tiempo. No se encontraron valores informados en la literatura para efectuar comparaciones.

7.4.2.4 Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido

El estudio se realizó por triplicado con concentración de fenol de 50 ppb, se trabajó con diferentes valores de temperatura (10, 15, 22.5, 30 y 35°C).

Hipótesis nula

H_0 = Las variaciones en la temperatura no influyen en el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F_{calc}	$F_{critica}$	dms	P	v
1.Muestra (a)	2.60	3.48	0.0274	0.10	14
2.Muestra (b)	2.10	3.48	0.0309	0.15	14
3.Blanco	1.10	3.48	0.0229	0.41	14

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

El blanco se leyó contra cloroformo

Estos resultados muestran que la temperatura no tiene efecto apreciable sobre la estabilidad del compuesto colorido, ya que en ningún estudio se rechaza la hipótesis nula (tablas C-4, C-5 y C-6, Anexo IV).

7.4.2.5 Estudio del efecto de la variación en la concentración de MBTH en el desarrollo del compuesto colorido

Se utilizaron disoluciones de MBTH de concentración 0.0375, 0.0500 y 0.0625%. Se trabajó por duplicado y con muestras de diferente concentración de fenol (10 y 50 ppb).

Hipótesis nula:

H_0 = La variación en la concentración del MBTH no afecta el desarrollo del compuesto colorido.

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{critica}	dms	P	v
1. Muestra I-a	7.59	9.55	0.0144	0.067	5
2. Muestra III-a	169.27	9.55	0.0080	0.001	5
3. Blanco	0.60	9.55	0.0052	0.604	5

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se puede aceptar la hipótesis nula para el estudio 2. Si se consideran los resultados de la tabla C-7 del Anexo IV; en el estudio 1 la diferencia entre las muestras con concentración de MBTH de 0.0375 y 0.0625% no superan la dms. Sin embargo, en el estudio 2, la diferencia entre las muestras rebasa el valor de la dms, por lo cual se puede deducir que existen diferencias significativas cuando se cambia la concentración del MBTH. Por otra parte, en el estudio del blanco no existe diferencia en los resultados obtenidos con concentraciones de MBTH de 0.0375 y 0.0625%.

Los resultados no muestran una tendencia clara ya que los valores de absorbancia son menores cuando se utiliza una concentración de MBTH de 0.05% (valor recomendado³⁰) y no para 0.0375% como se esperaba; además los resultados obtenidos con esta última concentración son casi iguales o en algunos casos superiores a los obtenidos con una concentración de MBTH de 0.0625%. no encontrándose alguna explicación.

7.4.2.6 Estudio del efecto de la variación en la concentración de sulfato amonocérico en el desarrollo del compuesto colorido

En el estudio se utilizaron disoluciones de sulfato amonocérico de concentración de 0.75, 1 y 1.25%. Se trabajó por duplicado, y con dos concentraciones de fenol (10 y 50 ppb).

H₀ = El cambio en la concentración de sulfato amonocérico no afecta el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{critica}	dms	P	v
1. Muestra I-a	7.68	9.55	0.0080	0.07	5
2. Muestra III-a	0.36	9.55	0.0252	0.72	5
3. Blanco	0.19	9.55	0.0138	0.84	5

a= se refiere a las lecturas realizadas contra cloroformo como blanco

Ver Tabla C-8, Anexo IV

1. No existen diferencias entre 0.75% y 1.25%, en los otros casos se rebasa la dms. Para una concentración de oxidante de 1% la absorbancia es menor, es probable que se haya cometido un error con esta muestra.

2. En este caso se acepta la dms, ya que no se presentan diferencias entre las distintas concentraciones de oxidante.
3. No hay diferencias significativas en ningún caso.

Con las concentraciones de sulfato amonocérico que se utilizaron, no se ha puesto en evidencia que la variación en las mismas afecta el desarrollo del compuesto colorido.

7.4.2.7 Determinación del porcentaje de recuperación en muestras sintéticas

Se destilaron aproximadamente 450 mL de muestra, se dejó enfriar, se adicionaron 50 mL de agua purificada al matraz, posteriormente se continuó con la destilación, hasta completar un volumen de 500 mL. Se desarrolló el color de acuerdo al procedimiento ya descrito.

Resultados:

Determinación	Porcentaje de recuperación (%)
1	96.86
2	99.10
Promedio:	<u>97.98%</u>

El porcentaje de recuperación es muy satisfactorio, ya que el 97.98% de fenol se ha recuperado. No se encontraron valores informados en la literatura.

Nota: Por problemas en la determinación de fenoles en muestras reales (interferencias) con el método del MBTH (con y sin extracción) no se realizaron determinaciones del porcentaje de recuperación en este tipo de muestras.

7.4.3 Método sin extracción

7.4.3.1 Curvas de calibración

Se prepararon estándares de 100 mL con las siguientes concentraciones de fenol: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 1.2 ppm. Posteriormente se adicionaron 4 mL de disolución de MBTH al 0.2%, se agitó, e inmediatamente después se adicionaron 2.5 mL de disolución de sulfato amonocérico al 1%, se agitó durante 2 minutos, se adicionaron 7 mL de disolución amortiguadora de trabajo, se agitó y se dejaron transcurrir 10 minutos; finalmente se leyó la absorbancia a la longitud de onda entre 522 y 524 nm. El procedimiento se realizó de acuerdo a Method 9067 A-Phenolics-Spectrophotometric, MBTH with distillation.³⁰ Se encontró que con una concentración de MBTH de 0.2% los valores de absorbancia fueron superiores

que con 0.05%, por lo cual se decidió trabajar con 0.2% para el método sin extracción.

7.4.3.2 Datos obtenidos de las curvas de calibración

a) Intervalo lineal

0-1.2 ppm

Para concentraciones superiores a 1.2 ppm, el comportamiento de la curva deja de ser lineal, además se observa la formación de un precipitado. Es posible que por esta desviación a la ley de Beer el método normalizado recomienda como valor máximo 1 ppm.³⁰

b) Linealidad

Resultados de la regresión lineal:

Pendiente = $0.1754 \pm 0.0139 \text{ ppm}^{-1}$

Ordenada al origen = 0.0200 ± 0.0108

Coefficiente de correlación = 0.9984

El coeficiente de correlación es aceptable, por lo que se puede deducir que se tiene una linealidad satisfactoria, ver Gráfica en Anexo III.

c) Longitud de onda de máxima absorción

522-524 nm

El intervalo obtenido es ligeramente superior al informado que es de 520nm.^{30,33}

d) Valor de absorptividad molar

$19653 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$

Valor informado: $26000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ³³

El valor obtenido aunque es inferior al informado. La diferencia puede tener varias causas, como las indicadas en el inciso 7.3.3.2.

e) Limite de detección

Método A = 0.07 ppm

Método B = 0.06 ppm

Los valores obtenidos son muy cercanos al valor informado, 0.05 ppm.³⁴ Por otra parte, no existe mucha diferencia entre los dos métodos de cálculo A y B.

f) Limite de cuantificación

Método A = 0.24 ppm

Método B = 0.12 ppm

El valor obtenido con el método A, es el doble al obtenido con el B, en este caso existe mucha diferencia con respecto al método utilizado. No se encontraron valores informados.

g) Precisión
2.36%

Intervalo de concentración estudiado: 0.53 - 0.78 ppm, 11 determinaciones por duplicado.

Datos informados:
7.6%

Disolución estándar de fenol de 0.15 ppm, 10 determinaciones³³

La precisión obtenida es mejor a la que se encontró en la literatura, muy probablemente por el nivel de concentración utilizado en cada caso.

7.4.3.3 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Las muestras se trabajaron por quintuplicado con concentración de fenol de 1 ppm, y el blanco por triplicado. El estudio de la estabilidad de las muestras se realizó durante un intervalo de tiempo de 8.75 horas. Se utilizaron tubos HACH® para realizar las lecturas, las muestras se guardaron para no ser expuestas a la luz en los momentos en que no se realizaron lecturas.

Hipótesis nula:

H_0 = El transcurso del tiempo no afecta la estabilidad del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc}	F _{crítica}	dms	P	v
1.Muestra (a)	0.49	1.99	0.0144	0.90	59
2.Muestra (b)	0.85	1.99	0.0132	0.59	59
3.Blanco	7.70	2.21	0.0027	1.65x10 ⁻⁵	35

a= se refiere a las lecturas realizadas contra agua destilada como blanco

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

El blanco se leyó contra agua destilada

De acuerdo a los resultados obtenidos (ver tabla D-1, D-2 y D-3 en el Anexo IV), en el primer estudio no se observan diferencias significativas en el intervalo de tiempo estudiado; para el segundo estudio, se observan pequeñas diferencias a partir de 6.25 horas, pero no son lo suficientemente altas como para poder rechazar la hipótesis nula. Finalmente en el caso del blanco la dms se ve rebasada para valores de tiempo superiores a 4.25 horas.

La muestra es estable durante 8.75 horas, y se puede leer contra un blanco cuya preparación no haya rebasado las 4.25 horas. Esto es superior al tiempo de estabilidad informado, que es de 4 horas para la muestra.³⁴

7.4.3.4 Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido

El estudio se realizó por triplicado con una concentración de fenol de 1 ppm y se trabajó con valores de temperatura de 10, 15, 25, 30 y 35°C

H_0 = Las variaciones en la temperatura no influyen en el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F_{calc}	$F_{critica}$	dms	P	v
1. Muestra (b)	0.17	3.48	0.0088	0.95	14

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra

Se acepta la hipótesis nula con una probabilidad cercana a la unidad, por lo que se puede afirmar que, en el intervalo de temperatura estudiado, no se ha puesto en evidencia que este factor influye sobre el desarrollo del compuesto colorido (ver tabla D-4 en Anexo IV).

7.4.3.5 Estudio del efecto de la variación en la concentración de MBTH en el desarrollo del compuesto colorido

Se utilizaron disoluciones de MBTH de concentración 0.05, 0.2 y 0.3 % y tres concentraciones de fenol (0.2, 0.5 y 1 ppm). El estudio se realizó por triplicado.

H_0 = La variación en la concentración de MBTH no afecta el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F_{calc}	$F_{critica}$	dms	P	v
1. Muestra I-a	3000	5.14	0.0011	9.97×10^{-10}	8
2. Muestra I-b	40031	5.14	0.0005	4.21×10^{-13}	8
3. Muestra II-a	215	5.14	0.0092	2.6×10^{-6}	8
4. Muestra II-b	497	5.14	0.0088	2.16×10^{-7}	8
5. Muestra III-a	224	5.14	0.0144	2.32×10^{-6}	8
6. Muestra III-b	268	5.14	0.0142	1.35×10^{-6}	8
7. Blanco	8.05	5.14	0.0138	2×10^{-2}	8

a= se refiere a las lecturas realizadas contra agua destilada como blanco.

b= se refiere a las lecturas realizadas contra el blanco de muestra.

El blanco se leyó contra agua destilada

En todos los estudios realizados los valores calculados de F son superiores a los valores críticos, y de acuerdo a los valores de probabilidad se rechaza. Si se

analizan los resultados que se encuentran en la tabla D-5, se observa algo similar para el estudio de concentración de 4-AAP en el método sin extracción (sección 7.3.3.5), ya que al comparar los resultados obtenidos con las concentraciones de MBTH de 0.05% y 0.2%, para 0.2% la absorbancia de las muestras es superior; sin embargo, al comparar los resultados con concentraciones de MBTH de 0.2 y 0.3% se esperaría que para la última concentración de MBTH se obtuvieran valores superiores, y se obtienen valores ligeramente menores; no se tiene una explicación a tal hecho.

Estas son algunas observaciones, después de comparar los resultados:

- a) Para los estudios 1 y 2 se observan diferencias significativas en las disoluciones con diferente concentración de MBTH, se observa una mayor absorbancia cuando la concentración de MBTH es de 0.2%.
- b) Con respecto a los estudios 3, 4, 5, 6 y 7 no se observan diferencias significativas cuando se trabaja con concentración de MBTH de 0.2 y de 0.3%.

Se recomienda trabajar con una concentración de 0.2% con el propósito de obtener un mayor desarrollo en el compuesto colorido. Los valores de absorbancia obtenidos cuando se utiliza la concentración de MBTH indicada en el método normalizado (0.05%),³⁰ son inferiores a los obtenidos con 0.2 y 0.3%, por lo que no se recomienda trabajar con dicha concentración. De acuerdo a la literatura consultada, la disolución puede ser estable durante una semana, si se mantiene en refrigeración, por lo cual no es necesario prepararla cada vez que se utilice.
33,37

7.4.3.6 Estudio del efecto de la variación en la concentración de sulfato amonocérico en el desarrollo del compuesto colorido

Se utilizaron disoluciones de sulfato amonocérico 0.5, 1 y 1.5% y tres concentraciones de fenol (0.2, 0.5 y 1 ppm). El estudio se realizó por triplicado.

Hipótesis nula:

H_0 = El cambio en la concentración de sulfato amonocérico no afecta el desarrollo del compuesto colorido

Resultados del análisis de varianza

Tipo de estudio	F _{calc.}	F _{crítica}	dms	P	v
1. Muestra I-a	307	5.14	0.0038	9.09×10^{-7}	8
2. Muestra I-b	87.45	5.14	0.0038	3.65×10^{-5}	8
3. Muestra II-a	237	5.14	0.0071	1.96×10^{-6}	8
4. Muestra II-b	141	5.14	0.0067	9.10×10^{-6}	8
5. Muestra III-a	27	5.14	0.0339	1.04×10^{-3}	8
6. Muestra III-b	21	5.14	0.0336	1.89×10^{-3}	8
7. Blanco	40.25	5.14	0.0052	3.30×10^{-4}	8

Para todos los estudios se rechaza la hipótesis nula, por lo que se puede concluir que con las concentraciones de oxidante utilizadas, existen evidencias que la variación en la concentración de sulfato amonocérico es un factor que influye en el desarrollo del compuesto colorido. De acuerdo a los resultados obtenidos que se encuentran en la tabla D-6 del Anexo IV, se observa que a medida que aumenta la concentración de oxidante los valores de absorbancia aumentan.

Se compararon las diferencias de los promedios de las mediciones dentro de cada estudio con la diferencia mínima significativa, a continuación se tienen algunas observaciones importantes:

- a) En el caso de los estudios 1, 3, 4 y 5, existen variaciones significativas para cada una de las concentraciones de sulfato amonocérico. A mayor concentración de oxidante la absorbancia es mayor.
- b) Para los estudios 2 y 6, no se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos con concentraciones de oxidante de 1 y 1.5%.
- c) Para el estudio del blanco no se encuentran diferencias significativas para concentraciones oxidante de 1 y 1.5%.

Se recomienda utilizar una concentración de oxidante de 1.5% ya que se obtienen valores de absorbancia mayores. La concentración recomendada en la literatura es de 1%.³⁰

7.4.3.7 Determinación del % de recuperación en muestras sintéticas

Se destilaron aproximadamente 90 mL de la muestra, se dejó enfriar, se adicionaron 10 mL de agua, se completó la destilación hasta tener un volumen de destilado de 100 mL. Las muestras se trataron de acuerdo al procedimiento ya descrito para las curvas de calibración. Se preparó una muestra testigo que no se destiló y finalmente se compararon los resultados.

Resultados:

Determinación	Porcentaje de recuperación (%)
1	99.16
2	95.11
3	97.90
4	97.90
5	97.02
Promedio:	<u>97.42 %</u>

El porcentaje de recuperación obtenido es satisfactorio. No se encontraron valores informados en la literatura para efectuar comparaciones.

7.5 Determinación de fenoles en muestras reales por el Método de la 4-AAP y del MBTH (sin extracción)

Se realizó la determinación de fenoles con varias muestras de agua residual con el propósito de comparar los métodos en el análisis de rutina del laboratorio.

Muestra A

Aspecto de la muestra: color gris café, con pequeñas partículas suspendidas de color negro.

Tratamiento: con el propósito de eliminar los sólidos se filtró la muestra, se produjo espuma al momento de filtrar, posteriormente se destiló.

Análisis: La muestra se trató de acuerdo a los procedimientos descritos para 4-AAP y MBTH sin extracción.

Resultados:

Método	Absorbancia	Concentración (ppm)
4-AAP	0.0319	0.24
MBTH	0.1200	0.58

Observaciones:

En el método del MBTH se observó color verde bandera después de la adición de oxidante, probablemente por presencia de aldehídos en la muestra, después de la adición de la disolución amortiguadora el color cambió a amarillo claro. Para el método de la 4-AAP se observó un color rojo claro.

Muestra B

Aspecto de la muestra: color gris rojo, con pequeñas partículas suspendidas de color negro.

Tratamiento: Con el propósito de eliminar los sólidos se filtró y posteriormente se destiló; sin embargo, se observó turbidez y además de formaron sólidos en la disolución, por lo que fue necesario filtrar nuevamente.

Análisis: Ya se especificó en la muestra A.

Resultados:

Método	Absorbancia	Concentración (ppm)
4-AAP	0.0659	0.50
MBTH	0.0813	0.40

Observaciones: En el método del MBTH se observó color verde esmeralda después de la adición de sulfato amonocérico, como en la muestra anterior. Después de la adición de la disolución amortiguadora el color cambió a verde limón. Como se sospechó que la muestra contenía aldehídos, se obtuvieron los espectros antes y después de la adición de disolución amortiguadora, en el primer espectro se observa la banda característica de absorción de los aldehídos alrededor de 650nm.^{37,56} En el segundo espectro esta banda desaparece; esto concuerda con la literatura.

Muestra C

Aspecto de la muestra: Incolora

Tratamiento: No se filtró ya que la muestra no presentaba turbidez, durante la destilación se generó espuma.

Análisis: Ya descrito

Resultados:

Método	Absorbancia	Concentración (ppm)
4-AAP	0.0110	0.08
MBTH	0.0770	0.38

Observaciones:

En el método del MBTH se observó color verde claro después de la adición del oxidante, y al igual que la muestra B esto se debe a la presencia de aldehídos, después de la adición de la disolución amortiguadora el color cambió a amarillo claro. Se obtuvieron los espectros antes y después de la adición de disolución amortiguadora, en el primer espectro se observa la banda característica banda de absorción de los aldehídos alrededor de 650nm^{37,56}. En el segundo espectro esta banda desaparece.

Muestra D

Aspecto de la muestra: color rojo con sólidos negros suspendidos

Tratamiento: se filtró y destiló

Análisis: ya descrito anteriormente.

Resultados:

Método	Absorbancia	Concentración (ppm)
4-AAP	0.1361	1.04
MBTH	0.0957	0.47

Observaciones:

Con respecto al método del MBTH, después de que se adicionó sulfato amonocérico la muestra tomo un color entre naranja-café, el color posterior a la adición de disolución amortiguadora fue naranja.

Nota: Los frascos que contenían a las muestras A y B tenían la misma clave, se trataron por separado debido a que no tenían la misma apariencia, finalmente se obtuvieron valores de absorbancia diferentes. Este puede ser un error de muestreo, por lo cual es importante señalar que es necesario homogenizar el contenido de los frascos que contengan la misma muestra, con el propósito de obtener valores más representativos.

Conclusiones de este estudio:

Para algunas muestras la concentración de fenol determinada con el método del MBTH en comparación con el método de la 4-AAP (muestras A y C) es mayor, y en otras sucede lo contrario (B y D). A pesar de que se esperaba que para el método del MBTH los resultados fueran mayores, se puso en evidencia que, para algunas muestras no es suficiente la destilación como procedimiento de limpieza de la muestra³⁷ y se requiere de otros.⁴⁸

En algunos estudios con muestras de aguas de ríos no se encontraron diferencias con los dos métodos.³⁷ Gales realizó un estudio de muestras residuales superficiales, de refinería y de uso doméstico,³⁴ en la mayoría de los casos los valores fueron mayores con el método del MBTH. Aunque éste método puede tener ciertas ventajas su utilidad y aplicabilidad puede determinarse sólo después de un análisis exhaustivo con una gran variedad de muestras; se ha podido demostrar que con muestras que tienen gran cantidad de cresol, naftol y fenoles *para* sustituidos se tienen buenos resultados.³⁴

En el método del MBTH cuando se adiciona la disolución amortiguadora desaparecen los compuestos coloridos que se forman con los aldehídos; sin embargo, no se eliminan las interferencias del todo, ya que el color final de la disolución no es parecido al obtenido en las muestras sintéticas (rosa-púrpura), además aunque supuestamente el método no es sensible a cambios de pH se ha encontrado en la literatura que la disolución final con la adición de la disolución amortiguadora debe tener un pH final entre 7.3 y 7.6,³⁷ esto no sucede ya que debido a que las muestras reales se han preservado en medio ácido la adición de la disolución amortiguadora no es suficiente para alcanzar el pH neutro, se obtienen valores de pH entre 5 y 6. Por consiguiente es más recomendable utilizar el método de la 4-AAP, ya que se forman compuestos de color parecido al esperado (rojo-marrón) y la destilación es suficiente para eliminar las interferencias.

ANÁLISIS
DE
RESULTADOS

8. Análisis de resultados

8.1 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS

a) Métodos con extracción

Características	4-AAP C/E	MBTH C/E
Intervalo lineal	0-160 ppb	0-60 ppb
Regresión lineal	m= 0.0043 ± 0.0001 ppb ⁻¹ b= -0.0120 ± 0.0082 r= 0.9997	0.0044 ± 0.0002 ppb ⁻¹ 0.0094 ± 0.0075 0.9992
Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$)	457-458 nm	489-490 nm
Valor de Absortividad molar (ϵ) [cm ⁻¹ mol ⁻¹ L]	(1.50 ± 0.03) × 10 ⁴	(1.77 ± 0.06) × 10 ⁴
Límite de detección (Método A)	2.69 ppb	2.77 ppb
Límite de detección (Método B) ASTM	12.85 ppb	4.22 ppb
Límite de cuantificación (Método A)	8.97 ppb	9.25 ppb
Límite de cuantificación (Método B) ASTM	27.63 ppb	7.67 ppb
Precisión	2.41% Intervalo de concentración: 84.30 - 118.27 ppb 14 determinaciones por duplicado	0.42% intervalo de concentración: 36.97 - 46.33 ppb 15 determinaciones por duplicado
Estabilidad* en función del tiempo	(A) 4.97 h (B) 23.17 h	25.25 h 25.25 h
Estabilidad en función de la temperatura	(B) 15-30°C	10-35°C
Estabilidad en función de pH (sólo para 4-AAP)	8.5-10	No aplica
Estabilidad en función de [4-AAP] ó [MBTH]	**Hay variaciones	Hay variaciones
Estabilidad en función de [oxidante]	8-12% no cambios	No hay cambios
% de recuperación	muestras sintéticas 98.98% muestras reales 91.42%	97.98%

(A) = lecturas contra el disolvente como blanco

(B) = lecturas contra el blanco de muestra

* Se refiere a la estabilidad del compuesto colorido

** Con 4-AAP al 2% se obtienen los valores de absorbancia mayores

b) Métodos sin extracción

Característica	4-AAP S/E	MBTH S/E
Intervalo lineal	0-15 ppm	0-1.2 ppm
Regresión lineal	m= b= r=	0.1754 ± 0.0139 ppm ⁻¹ 0.0200 ± 0.0108 0.9984
Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$)	506 nm	522-524 nm
Valor de Absortividad molar (ϵ) [cm ⁻¹ mol ⁻¹ L]	(1.26 ± 0.01) × 10 ⁴	(1.96 ± 0.16) × 10 ⁴
Límite de detección (Método A)	0.13 ppm	0.07 ppm
Límite de detección (Método B) ASTM	0.21 ppm	0.06 ppm
Límite de cuantificación (Método A)	0.43 ppm	0.24 ppm
Límite de cuantificación (Método B) ASTM	0.29 ppm	0.12 ppm
Precisión	0.24%	2.36%
	Intervalo de concentración: 5.03 - 8.25 ppm 10 determinaciones por duplicado	Intervalo de concentración: 0.53 - 0.78 ppm 11 determinaciones por duplicado
Estabilidad en función del tiempo (A)	1.5 h	8.75h
(B)	1.5 h	8.75h
Estabilidad en función de la temperatura (B)	10-35°C	10-35°C
Estabilidad en función del pH (sólo para 4-AAP)	9.05-10.5	No aplica
Estabilidad en función de [4-AAP] ó [MBTH]	***Hay variaciones	Hay variaciones
Estabilidad en función de [oxidante]	8-12% no cambios	Hay variaciones
% de recuperación	96.96%	97.42%
muestras sintéticas	92.1 y 61%	
muestras reales		
Determinación de fenoles en muestras reales	A B C D	0.58 ppm 0.40 ppm 0.38 ppm 1.47 ppm

*** A mayor concentración de 4-AAP mayor absorbancia

8.2 Discusión de resultados

DISOLUCIONES

Estudio de estabilidad de las disoluciones de tiosulfato de sodio y fenol

De acuerdo a los resultados obtenidos, es necesario titular la disolución de tiosulfato cada vez que se utilice; es importante señalar que muy posiblemente la estabilidad de la disolución se haya visto afectada por la acción de microorganismos, por lo cual se sugiere que se adicione una mayor cantidad de agente preservante. Con respecto a la disolución de fenol, aunque en el segundo estudio es estable durante 190 días, conviene considerar el primer estudio en el que es estable sólo durante 1 día posterior a su preparación, ya que en éste se realizaron doce determinaciones y en el segundo estudio sólo tres.

MÉTODO DE LA 4-AAP

i) Con extracción

El intervalo lineal encontrado (160 ppb), es superior al recomendado en la literatura [100 ppb¹¹]. La linealidad del método es aceptable ($r=0.9997$). El máximo de absorción se encuentra (457-458 nm) muy cercano al indicado [460 nm(11)]. No fue posible comparar el valor de absortividad molar calculado ($1.5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), porque no se encuentra ningún valor informado en la literatura.

Con respecto al límite de detección, el valor calculado con el método A (2.69 ppb) es muy cercano al mencionado en la literatura para el método automatizado [2 ppb³⁷] y difiere notablemente al calculado por el método B (12.85 ppb); con esto se hace evidente que el método de cálculo influye en los valores obtenidos. Para el límite de cuantificación, no se mencionan valores en la literatura.

La precisión calculada (2.41%) es mejor a la mencionada en la literatura [3.3 (37) y 3.6%⁵⁰]; esto tal vez se debe al hecho de que el valor calculado se determinó a un nivel de concentración mayor, en el que existen menos riesgos de cometer errores.

Con respecto al de estabilidad del compuesto colorido en función del tiempo, el intervalo calculado en el que es estable (5 horas) es superior al informado en la literatura [3 horas³⁰].

En el estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido, se encontró que la temperatura no tiene efecto sobre el desarrollo del color en el intervalo que abarca de 15 a 30°C, y que éste se encuentra a valores menores al reportado [19-37°C⁵³].

Se comprobó que el desarrollo del compuesto colorido depende del pH de la disolución. A pH=8, se favorece la formación del compuesto colorido, mientras que a valores menores a este valor y superiores a 10 no se favorece la formación del compuesto, esto coincide con los resultados informados en la literatura (32). El intervalo de pH en el que no existen variaciones se encuentra entre 8.5 y 10; este intervalo se encuentra a valores menores de pH con respecto a los informados en la literatura [9-10.7⁵³ y 10.3-10.5⁵⁹]; además es más amplio el valor encontrado si se compara con el último de los informados.

No se encontraron resultados en la literatura en relación a estudios del comportamiento del compuesto colorido en función de la concentración de 4-AAP y ferricianuro de potasio. Para el estudio realizado en función de la concentración de 4-AAP (0.5, 2 y 5%), existen variaciones en la absorbancia, se encontró con 4-AAP al 2% se tiene un máximo desarrollo de color, se recomienda trabajar con esta concentración.

En el caso del estudio realizado en función de la concentración de ferricianuro de potasio (4, 8 y 12%), no existen variaciones en la absorbancia del compuesto colorido cuando se trabaja con 8 y 12% de oxidante; sin embargo, se recomienda trabajar con 8%, para economizar reactivo. Tanto la concentración de 4-AAP como la de ferricianuro recomendadas en este trabajo, coinciden con las que se indican en varios métodos normalizados.^{11,28,41,51}

El porcentaje de recuperación de fenol en muestras sintéticas es muy aceptable (99.0 %); no se encontraron valores informados en la literatura para realizar comparaciones. Con respecto al valor encontrado en muestras reales, (91.4 %), no se puede comparar rigurosamente con los valores de la literatura [78, 97 y 98 %³⁰], ya que la composición de las muestras y las interferencias presentes en las mismas son diferentes.

ii) Sin extracción

El intervalo lineal encontrado (0-15 ppm) es adecuado para el análisis de aguas residuales, y es superior al indicado en la literatura [0.1-2 ppm⁵⁰]. Por lo que se refiere a la linealidad del método, ésta es muy aceptable ($r=0.9999$). El máximo de absorción encontrado (506 nm) es muy cercano al indicado en la literatura [510nm¹¹]. El valor de absortividad molar encontrado [$(1.26\pm 0.01) \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$] es muy cercano al informado en la literatura [$1.4 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ ³³].

Los valores calculados de límite de detección y límite de cuantificación no se pudieron comparar ya que no existen valores informados en la literatura. Es importante señalar que los valores dependen del método de cálculo utilizado, para el límite de detección es menor el valor calculado con el método A, en el caso del límite de cuantificación sucede lo contrario.

La precisión calculada (0.24 %, intervalo de concentración = 5.03-8.25 ppm) es mejor a la mencionada en la literatura [1.81 %, 0.49-1.93 ppm⁵⁰]; posiblemente porque el valor calculado se determinó a un nivel de concentración mayor, en el que existen menos riesgos de cometer errores.

Con respecto al estudio de estabilidad del compuesto colorido en función del tiempo, el intervalo de tiempo calculado en el que es estable (1.5 horas) es inferior al informado en la literatura [3.17 horas⁴⁵].

En el estudio del desarrollo del compuesto colorido en función de la temperatura, se encontró que el intervalo en el que no existen variaciones significativas abarca de 10 a 35°C, no se encontraron valores informados en la literatura para realizar comparaciones.

Al igual que el método con extracción, se comprobó que el desarrollo del compuesto colorido depende del pH de la disolución. El intervalo de pH en el que no existen variaciones abarca de 9.05 a 10.5.

En el estudio realizado para evaluar el efecto de la concentración de 4-AAP (0.5, 2 y 5%), no existen variaciones si se comparan los valores de absorbancia que se obtienen con 4-AAP al 2 y 5%. Se recomienda trabajar con 2% que es el valor indicado en la literatura.¹¹

En el caso del estudio realizado para evaluar el efecto de la concentración de ferricianuro de potasio (4, 8 y 12%), no existen variaciones en la absorbancia del compuesto colorido cuando se trabaja con 8 y 12% de oxidante; sin embargo, se recomienda trabajar con 8%, para economizar reactivo. La concentración de 4-AAP y ferricianuro que se recomiendan en este trabajo, coinciden con las indicadas en los métodos normalizados que proponen diversos organismos.^{11,28,41,51}

El porcentaje de recuperación de fenol en muestras sintéticas es satisfactorio (97.0 %), no se encontraron valores informados en la literatura para realizar comparaciones. Con respecto al valor encontrado en muestras reales, para una muestra fue de 92.1 % y para otra de 61 %, ya que debido a que son muestras diferentes el contenido de las mismas varía; no se encontraron valores informados en la literatura para realizar comparaciones.

MÉTODO DEL MBTH

i) Con extracción

El intervalo lineal encontrado (0-60 ppb) es superior al recomendado en la literatura [50 ppb³⁰]. Por lo que se refiere a la linealidad del método, ésta es satisfactoria ($r=0.9992$). El máximo de absorción encontrado (489-490 nm) coincide con el indicado en la literatura [490 nm³⁰]. El valor de absortividad molar

encontrado $[(1.77 \pm 0.06) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}]$ superior al del método de la 4-AAP, por lo que este método tiene mayor sensibilidad que el de la 4-AAP; no se encontró un valor informado en la literatura para comparar con el nuestro valor.

Por lo que se refiere al límite de detección; el valor informado [1 ppb³⁴] es inferior a los valores calculados [2.77 ppb (método A) y 4.22 ppb (método B)]. No se encontraron valores informados del límite de cuantificación para comparar con los calculados. Como en los casos anteriores, los valores dependen del método de cálculo utilizado, para el límite de detección es menor el valor calculado con el método A; en el caso del límite de cuantificación sucede lo contrario.

La precisión calculada (0.42 %, 36.97 - 46.33 ppb) es mejor que la mencionada en la literatura [2.4 %, 5 ppb³⁷]; muy posiblemente porque el valor calculado se determinó a un nivel de concentración mayor, en el que existen menos riesgos de cometer errores.

Con respecto al estudio de estabilidad compuesto colorido en función del tiempo, el intervalo calculado en el que es estable es de 25.25 horas, este valor no se pudo comparar con valores informados, ya que no se encontraron en la literatura revisada.

En el estudio del desarrollo del compuesto colorido en función de la temperatura, en el intervalo estudiado (10 - 35°C), no se ha puesto en evidencia que este factor influye sobre el desarrollo de la reacción. No se encontraron valores informados en la literatura para realizar comparaciones con el intervalo encontrado.

Para el estudio realizado para evaluar el efecto de la concentración de MBTH (0.0375, 0.05 y 0.0625%), se comprobó que el desarrollo del compuesto colorido depende de la concentración de MBTH. Sin embargo, los resultados no son claros, ya que con MBTH al 0.0375% se observan los valores de absorbancia mayores, siendo que esto se esperaba con una concentración de MBTH de 0.0625%.

En el caso del estudio realizado para evaluar el efecto de la concentración de sulfato amonocérico (0.75, 1 y 1.5%), se encontró que no existen diferencias significativas con las variaciones de concentración. Se puede trabajar con el valor recomendado [1%³⁰], o con 0.75%.

El porcentaje de recuperación de fenol en muestras sintéticas es muy aceptable (97.98 %), no se encontraron valores informados en la literatura para realizar comparaciones.

ii) Sin extracción

El intervalo lineal encontrado (0-1.2 ppm) es superior al recomendado en la literatura [1 ppm³⁰]. Por lo que se refiere a la linealidad del método, ésta se considera aceptable ($r=0.9984$). El máximo de absorción encontrado (522-524 nm) es cercano al indicado en la literatura [520 nm³⁰]. El valor de absorptividad molar calculado ($1.96 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) es aproximado al valor mencionado en la literatura [$2.6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ³³], y es superior al calculado por el método sin extracción de la 4-AAP ($1.96 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), esto coincide con lo indicado en la literatura consultada.³³

Con respecto al límite de detección los valores obtenidos por los dos métodos son muy cercanos entre sí [0.07 ppm (método A) y 0.06 ppm (método B)]. En el caso del límite de cuantificación, el valor obtenido con el método A es superior al obtenido en el método B [0.24 ppm (método A) y 0.12 ppm (método B)]. No se encontraron valores informados en la literatura.

La precisión calculada (2.36 %, 0.53-0.78 ppm) es mejor que la mencionada en la literatura [7.6 %, 0.15 ppm³³]; como en los casos anteriores, la posible causa se puede ser que el valor calculado se determinó a un nivel de concentración mayor, en el que existen menores riesgos de cometer errores.

Con respecto al estudio de estabilidad del compuesto colorido en función del tiempo, éste es estable hasta por 8.75 horas, este valor supera el encontrado en la literatura [4 horas³⁴]. Además, se encontró que el compuesto colorido es estable en un intervalo de temperatura de 10-35°C.

En el estudio realizado para evaluar el efecto de la concentración de MBTH (0.05, 0.2 y 0.3%), se encontró que existen variaciones significativas en los valores de absorbancia al trabajar con diferentes concentraciones de MBTH. En el caso del valor recomendado [0.05 %³⁰], se tienen los valores más bajos. Por otra parte, para algunos estudios no se observaron diferencias significativas al trabajar con MBTH al 0.2 y 0.3%, mientras que para otros se obtuvieron valores de absorbancia superiores al trabajar con MBTH al 0.2 %. Se recomienda trabajar con de MBTH al 0.2%.

En el caso del estudio realizado para evaluar el efecto de la concentración de sulfato amonocérico (0.75, 1 y 1.5 %), se encontró que existen variaciones significativas con las variaciones de concentración de oxidante. Se recomienda trabajar con sulfato amonocérico al 1.5%, ya que con esta concentración se obtienen los valores de absorbancia mayores; cabe aclarar que la concentración recomendada en la literatura es de 1%.³⁰

El porcentaje de recuperación de fenol en muestras sintéticas es satisfactorio (97.42 %), no se encontraron valores informados en la literatura para efectuar comparaciones.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

i) Métodos con extracción

Aunque el intervalo lineal del método del MBTH es menor que el del método de la 4-AAP, dicho método tiene varias ventajas: el valor de absorptividad molar es mayor, los límites de detección y cuantificación son menores, es un método más preciso y el compuesto formado es estable durante un intervalo de tiempo mayor. Para los dos métodos existen variaciones en la absorbancia con el cambio de concentración de los reactivos principales, en el caso del oxidante existe un intervalo de concentración en el que no existen variaciones significativas. Para los métodos con extracción no se realizó una comparación con muestras reales, es posible que en muestras naturales que no tengan muchas interferencias sea conveniente utilizar el método del MBTH.

ii) Métodos sin extracción

Dentro de las ventajas que presenta el método del MBTH se encuentra que el valor de absorptividad molar es mayor (en el caso del fenol); en algunos casos los valores para límite de detección y cuantificación son menores, además el compuesto colorido es estable durante un intervalo de tiempo mayor.

Una de las ventajas del método de la 4-AAP radica en que el intervalo lineal es mucho mayor, esto es muy conveniente si se trabaja con aguas residuales, ya que se evita la necesidad de diluir, es un método más preciso; y, aunque es sensible a los cambios de pH, si éste se mantiene dentro del intervalo de estabilidad no hay problemas. La ventaja principal de este método se encuentra en el tratamiento de muestras reales, ya que no existen muchos problemas de interferencias.

NOTAS:

1. El tratamiento estadístico se realizó al nivel de confianza del 95%.
2. Aunque los métodos con extracción son recomendables para el análisis de aguas contaminadas con fenoles al nivel de ppb, y no para aguas residuales. Estos métodos se estudiaron debido a que en algunas ocasiones llegan aguas potables al laboratorio para su análisis.

9. Conclusiones

En este trabajo, se obtuvieron las principales características de desempeño de los métodos de determinación de fenol de la 4-AAP y el MBTH.

La mayoría de estas características no se encuentran documentadas en los métodos normalizados que se emplean para realizar las determinaciones de rutina en los laboratorios de análisis de aguas residuales.

La integración de los resultados obtenidos, la experiencia y los conocimientos adquiridos durante la realización del proyecto permitieron obtener varias conclusiones entre las cuales podemos resaltar las siguientes:

a) En relación a la estabilidad de las disoluciones, debido a que el tiosulfato de sodio se utiliza como disolución patrón secundario en la titulación del fenol y de acuerdo a los resultados obtenidos, es conveniente que se titule cada vez que se utilice. Con respecto a la disolución de fenol, ésta es estable durante el primer día posterior a su preparación.

b) Es de gran importancia que la implantación (validación interna o verificación) de un método, se realice antes de que éste se utilice en el análisis de rutina. Esto tiene como propósito el probar su validez para las muestras que comúnmente se analizan en el laboratorio, y que los usuarios comprueben su habilidad, así también como para determinar diferentes características que pueden ser de gran utilidad en el análisis mismo.

c) Para el método de la 4-aminoantipirina, se comprobó la dependencia del desarrollo del compuesto colorido con respecto a las variaciones del pH.

d) Los valores de absorptividad molar del compuesto colorido con método del MBTH son superiores a los obtenidos con el método de la 4-AAP, con esto se confirma lo informado en la literatura.

e) Después de realizar el estudio de comparación de los dos métodos (sin extracción) para aguas residuales; se concluye que aunque para algunas muestras con el método del MBTH se determinó una concentración mayor de fenol, es conveniente utilizar el método de la 4-AAP, ya que es menos sensible a las interferencias.

f) Se verificó, que los valores de los límites de detección y cuantificación dependen del método estadístico que se utilice para su cálculo. En el caso

de los métodos sin extracción, se obtienen valores más bajos para el método del MBTH. Con respecto a los métodos con extracción en algunos casos son muy similares los valores obtenidos para los métodos de la 4-AAP y el MBTH, en otros son mejores los obtenidos para el método del MBTH.

g) Al comparar los métodos con extracción, se observa una mejor precisión para el método del MBTH. En relación a los métodos sin extracción, la precisión es mejor para el método de la 4-AAP.

h) Con respecto a la norma mexicana NOM-AA-50, es necesario que indique, que el método de la 4-AAP que propone es útil para la determinación de fenoles para concentraciones inferiores de 100 ppb; es decir para el análisis de agua naturales. Cuando se desean analizar aguas residuales es conveniente utilizar el método sin extracción, que es útil para determinar concentraciones de fenoles superiores a 100 ppb. Debido a que el método sin extracción no forma parte de la norma, es necesario que se éste se incluya en la misma.

Finalmente, se puede que concluir que se alcanzaron los objetivos que se plantearon inicialmente en este trabajo.

ANEXO I

ANEXO I. Titulación de la disolución de tiosulfato de sodio y de la disolución de fenol

Tabla I-A. Titulación de la disolución de tiosulfato de sodio

Tiempo transcurrido (días)	Concentración de fenol (ppm)	Diferencia con respecto al día 0	Diferencia mínima significativa*	% de variación con respecto al día 0
0	0.0260	---	---	---
10	0.0254	-0.0006	0.0002	-2.31
17	0.0252	-0.0008	0.0002	-3.08
20	0.0252	-0.0008	0.0002	-3.08
21	0.0249	-0.0011	0.0002	-4.23
22	0.0249	-0.0011	0.0002	-4.29
31	0.0251	-0.0009	0.0002	-3.32
38	0.0253	-0.0007	0.0002	-2.69

* De acuerdo al Análisis de Varianza

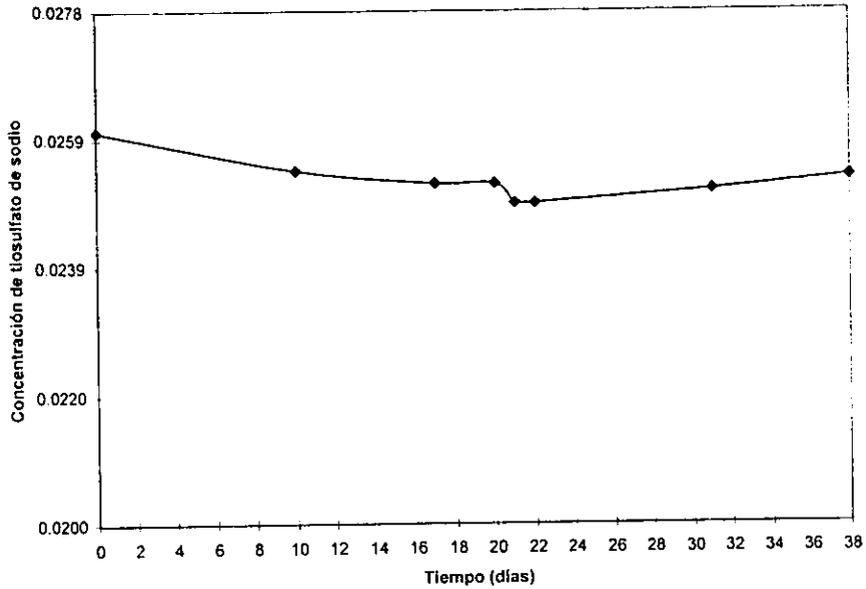
Tabla I-B. Titulación de la disolución de reserva de fenol - Estudio # 1

Tiempo transcurrido (días)	Concentración de fenol (ppm)	Diferencia con respecto al día 0	Diferencia mínima significativa	% de variación con respecto al día 0
0	1021	---	---	---
1	1016	-5.00	7.01	-0.49
5	1012	-9.25	7.01	-0.91
8	1013	-7.75	7.01	-0.76
11	1007	-14.00	7.01	-1.37
12	1014	-6.69	7.01	-0.66
14	992	-28.71	7.01	-2.81
22	1005	-16.00	7.01	-1.57
53	997	-24.00	7.01	-2.35
60	993	-28.00	7.01	-2.74
67	1002	-18.72	7.01	-1.83
92	1012	-8.69	7.01	-0.85

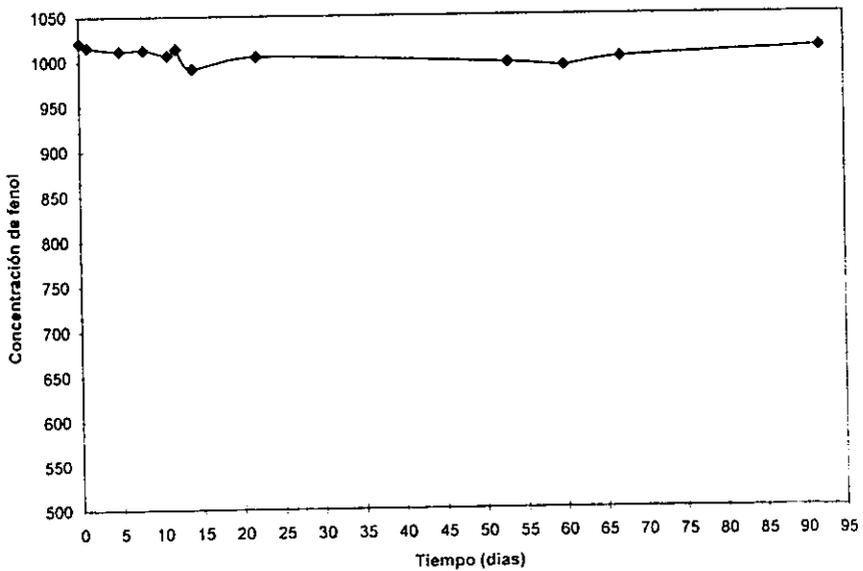
Tabla I-C. Titulación de la disolución de reserva de fenol - Estudio # 2

Tiempo transcurrido (días)	Concentración de fenol (ppm)	Diferencia con respecto al día 0	Diferencia mínima significativa	% de variación con respecto al día 0
0	1003	---	---	---
100	1005	2	8.75	0.24
190	1006	4	8.75	0.37

Gráfica I-A Titulación de la disolución de tiosulfato de sodio

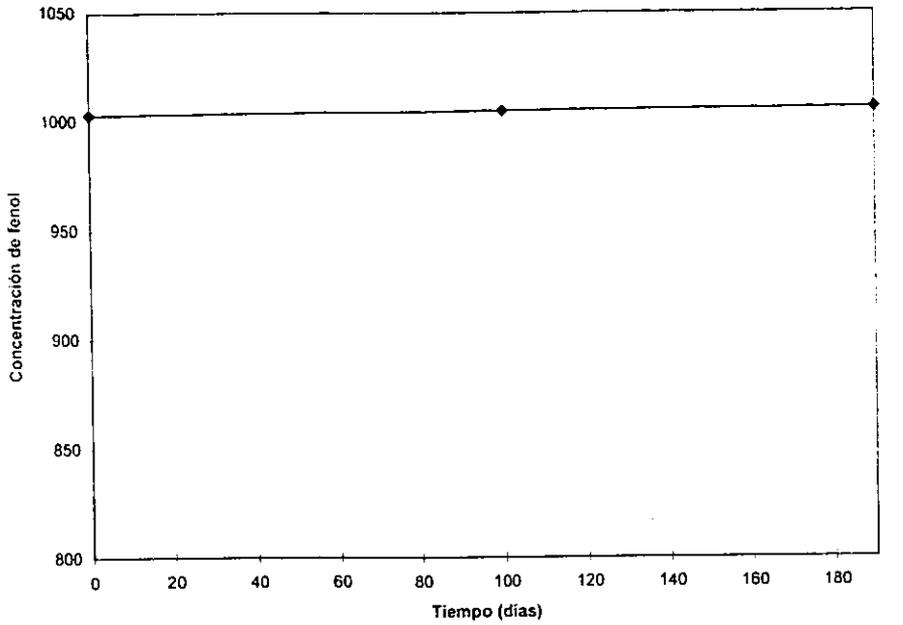


Gráfica I-B Titulación de la disolución de reserva de fenol
Estudio # 1

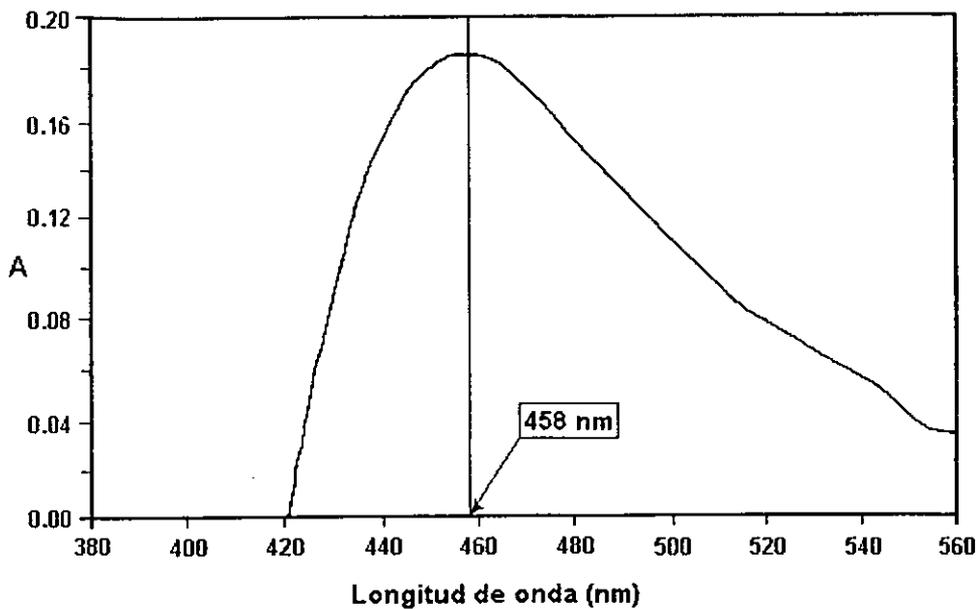


ANEXO II

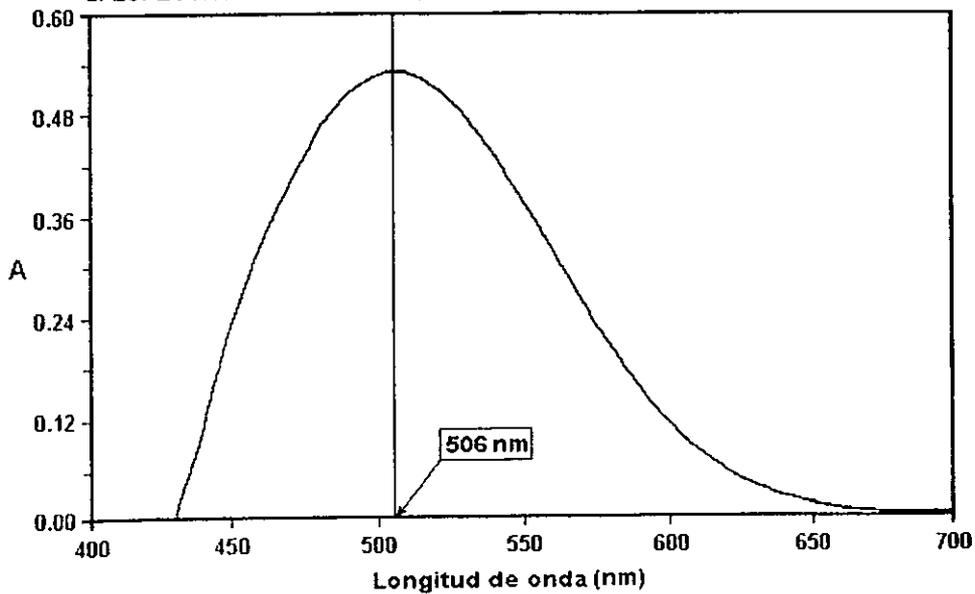
Gráfica I-C Titulación de la disolución de reserva de fenol
Estudio # 2



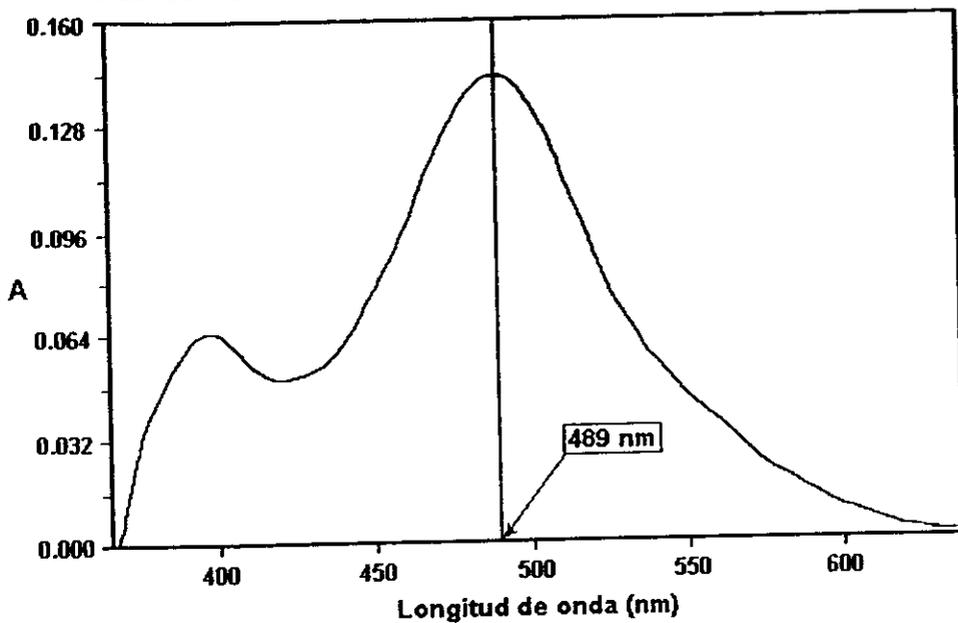
1. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL MÉTODO 4AAP-CE



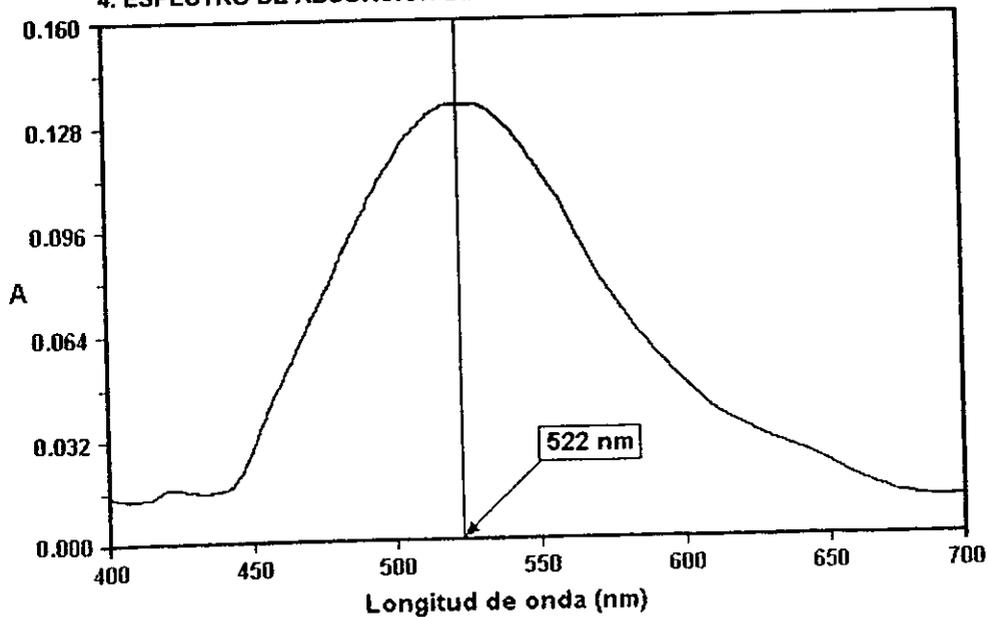
2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL MÉTODO 4AAP-SE



3. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL MÉTODO MBTH-CE



4. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL MÉTODO MBTH-SE



ANEXO III

ANEXO III. Curvas de calibración

En las siguientes tablas se muestran los resultados con los que se obtuvieron las diferentes curvas de calibración de cada uno de los métodos empleados.

Tabla III-A Curvas de calibración del método espectrofotométrico de la 4-AAP con extracción

Curva	LECTURAS DE ABSORBANCIA					
	10	20	40	60	80	100 ppb de fenol
1	0.0338	0.0669	0.1075	0.2305	0.3436	0.4187
2	0.0184	0.0545	0.1544	0.2024	0.2483	0.4135
3	0.0215	0.0761	0.1648	0.2570	0.3370	0.3517
4	0.0343	0.0774	0.1629	0.2619	0.3281	0.4528
5	0.0686	0.1514*	0.1980	0.2619	0.3687	0.4423

* valor rechazado por la prueba Q

Nota: Para la curva 5, se obtuvieron valores de absorbancia adicionales

($m=0.0042$, $b=0.0238$, $r=0.9991$)

	120	140	160 ppb de fenol
	0.5168	0.6057	0.7068

Tabla III-B Curvas de calibración del método espectrofotométrico de la 4-AAP sin extracción

Curva	LECTURAS DE ABSORBANCIA						
	1	3	5	7	9	11	15 ppm de fenol
1	0.1469	0.4053	0.6756	0.9593	1.2217	---	---
2	0.1314	0.4042	0.6734	0.9515	1.1969	---	---
3	0.1355	0.4060	0.6741	0.9507	1.2153	1.4861	2.0050
4	0.1405	0.4102	0.6854	0.9760	1.2369	1.5219	2.0406
5	0.1346	0.3958	0.6618	0.9257	1.1713	1.4512	1.9693
6	0.1328	0.3992	0.6660	0.9307	1.1928	1.3354*	1.9810
7	0.1314	0.4011	0.6652	0.9382	1.1883	1.4665	2.0059
8	0.1338	0.4037	0.6742	0.9490	1.2134	1.4912	2.0200

* valor rechazado por la prueba Q

Tabla III-C Curvas de calibración del método espectrofotométrico del MBTH con extracción

Curva	LECTURAS DE ABSORBANCIA						
	5	10	20	30	40	50	60 ppb de fenol
1	---	0.0541	0.1009	0.1476	0.1963	0.2562	0.2713
2	---	0.0606	0.1096	0.1429	0.1904	0.2297	0.2597
3	0.0273	0.0530	0.1001	0.1430	0.1799	0.1929	0.2593
4	0.0257	0.0532	0.0992	0.1415	0.1786	0.2283	0.2572
5	0.0257	0.0552	0.0921	0.1408	0.1811	0.2241	0.2522
6	0.0240	0.0507	0.1092	0.1589*	0.1841	0.2299	0.2879
7	0.0248	0.0517	0.0988	0.1392	0.2067	0.2423	0.2927

* valor rechazado por la prueba Q

Tabla III-D Curvas de calibración del método espectrofotométrico del MBTH sin extracción

Curva	LECTURAS DE ABSORBANCIA					
	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2 ppm de fenol
1	0.0477	0.0908	0.1211	0.1618	0.1906	0.2324
2	0.0523	0.0962	0.1325	0.1620	0.2095	0.2101
3	0.0512	0.0980	0.1203	0.1723	0.1983	0.2309
4	0.0515	0.0934	0.1319	0.1559	0.2019	0.2349
5	0.0514	0.0924	0.1202	0.1701	0.1872	0.2141
6	0.0514	0.0910	0.1309	0.1655	0.2005	0.2405
7	0.0485	0.0881	0.1221	0.1647	0.1905	0.2177

Tabla III-E Resultados de la regresión lineal del método espectrofotométrico de la 4-AAP con extracción

Curva	$y = (m \pm IC_m) \text{ ppb}^{-1} x$	+	$(b \pm IC_b)$	r
1	$y = (0.0043 \pm 0.0007) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(-0.0187 ± 0.0387)	0.9904
2	$y = (0.0039 \pm 0.0008) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(-0.0158 ± 0.0479)	0.9822
3	$y = (0.0039 \pm 0.0007) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0013 ± 0.0387)	0.9882
4	$y = (0.0045 \pm 0.0004) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(-0.0092 ± 0.0197)	0.9976
5	$y = (0.0043 \pm 0.0004) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0137 ± 0.0247)	0.9977

Tabla III-F Resultados de la regresión lineal del método espectrofotométrico de la 4-AAP sin extracción

Curva	$y = (m \pm IC_m) \text{ ppm}^{-1} x$	+	$(b \pm IC_b)$	r
1	$y = (0.1356 \pm 0.0024) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0032 ± 0.0125)	0.9999
2	$y = (0.1340 \pm 0.0030) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0010 ± 0.0156)	0.9999
3	$y = (0.1341 \pm 0.0012) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0042 ± 0.0096)	0.9999
4	$y = (0.1367 \pm 0.0019) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0048 ± 0.0151)	0.9999
5	$y = (0.1312 \pm 0.0011) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0025 ± 0.0086)	0.9999
6	$y = (0.1321 \pm 0.0006) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0026 ± 0.0044)	0.9998
7	$y = (0.1335 \pm 0.0010) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(-0.0015 ± 0.0082)	0.9999
8	$y = (0.1350 \pm 0.0007) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0002 ± 0.0054)	0.9999

Tabla III-G Resultados de la regresión lineal del método espectrofotométrico del MBTH con extracción

Curva	$y = (m \pm IC_m) \text{ ppb}^{-1} x$	+	$(b \pm IC_b)$	r
1	$y = (0.0047 \pm 0.0005) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0059 ± 0.0184)	0.9955
2	$y = (0.0040 \pm 0.0004) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0251 ± 0.0143)	0.9978
3	$y = (0.0041 \pm 0.0005) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0096 ± 0.0166)	0.9928
4	$y = (0.0042 \pm 0.0003) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0106 ± 0.0105)	0.9982
5	$y = (0.0043 \pm 0.0003) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0072 ± 0.0094)	0.9978
6	$y = (0.0047 \pm 0.0003) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0035 ± 0.0114)	0.9981
7	$y = (0.0049 \pm 0.0002) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0007 ± 0.0081)	0.9988

Tabla III-H Resultados de la regresión lineal del método espectrofotométrico del MBTH sin extracción

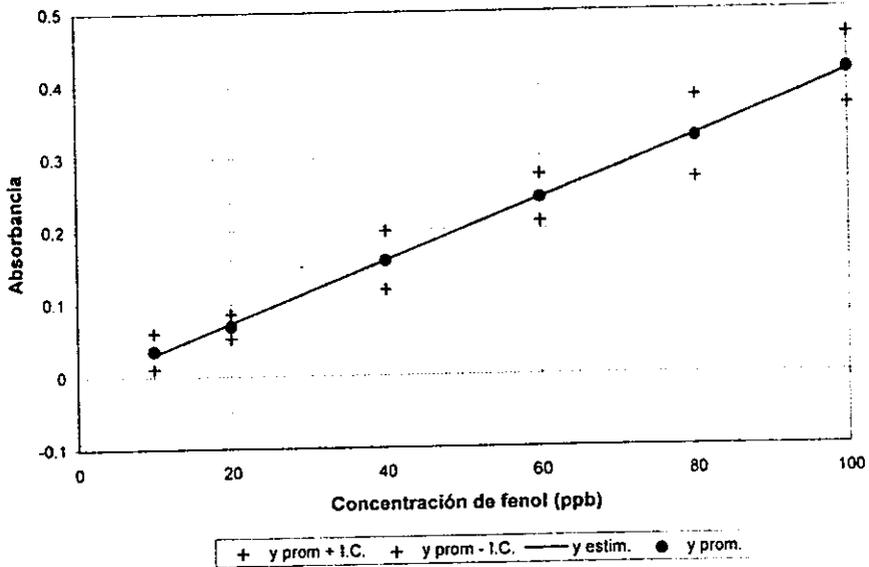
Curva	$y = (m \pm IC_m) \text{ ppm}^{-1} x$	+	$(b \pm IC_b)$	r
1	$y = (0.1805 \pm 0.0126) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0144 ± 0.0098)	0.9987
2	$y = (0.1804 \pm 0.0353) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0150 ± 0.0255)	0.9858
3	$y = (0.1788 \pm 0.0241) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0200 ± 0.0188)	0.9953
4	$y = (0.1809 \pm 0.0166) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0183 ± 0.0130)	0.9978
5	$y = (0.1640 \pm 0.0291) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0245 ± 0.0227)	0.9919
6	$y = (0.1869 \pm 0.0069) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0158 ± 0.0054)	0.9996
7	$y = (0.1708 \pm 0.0200) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0190 ± 0.0155)	0.9965

Nota : Para las curvas de calibración, cuyo número que las identifica se encuentra en letras negritas, se ha encontrado que el punto (0,0) forma parte de la población de puntos.

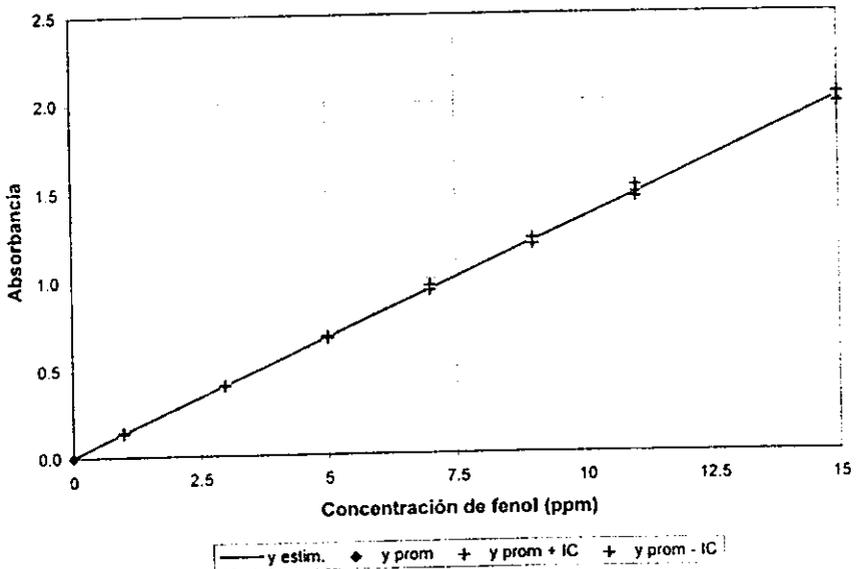
Tabla III-I Resultados de la regresión lineal de la curva representativa de cada método

Método	$y = (m \pm IC_m) [] x$	+	$(b \pm IC_b)$	r
4-AAP C/E	$y = (0.0043 \pm 0.0001) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(-0.0120 ± 0.0082)	0.9997
4-AAP S/E	$y = (0.1339 \pm 0.0010) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0029 ± 0.0082)	0.9999
MBTH C/E	$y = (0.0044 \pm 0.0002) \text{ ppb}^{-1} x$	+	(0.0094 ± 0.0075)	0.9992
MBTH S/E	$y = (0.1754 \pm 0.0139) \text{ ppm}^{-1} x$	+	(0.0200 ± 0.0108)	0.9984

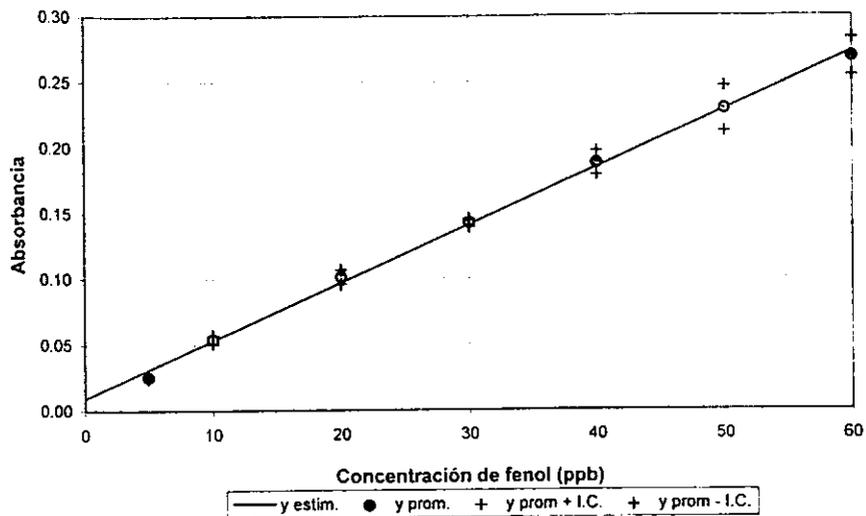
Gráfica III-1 Curva de regresión ajustada 4-AAP C/E



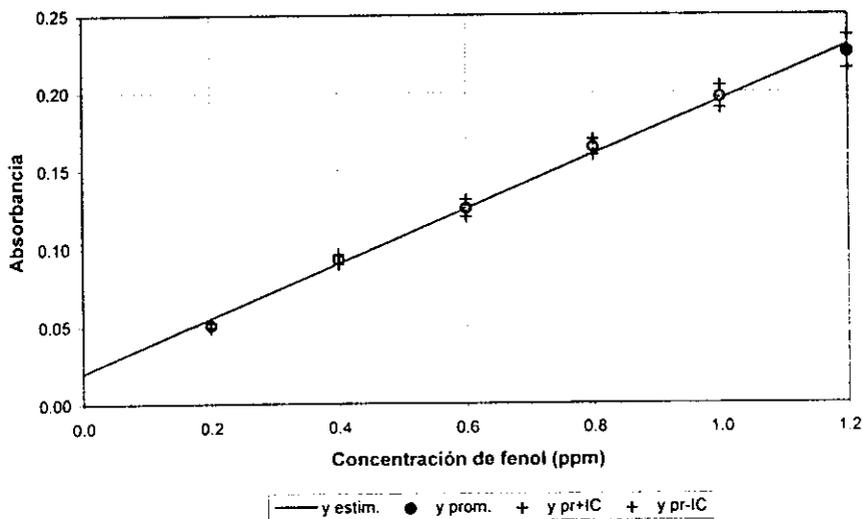
Gráfica III-2 Curva de regresión ajustada 4-AAP S/E



Gráfica III-3 Curva de regresión ajustada MBTH C/E



Gráfica III-4 Curva de regresión ajustada MBTH S/E



ANEXO IV

ANEXO IV. Resultados de los diferentes estudios

1. METODO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA 4-AAP

A) Método con extracción

Tabla A-1 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido
Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración: 100 ppb

TIEMPO TRANSCURRIDO (Horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA		
	(Estudio realizado por triplicado)		
0.58	0.5160	0.5082	0.5238
0.77	0.5248	0.5170	0.5326
1.17	0.5289	0.5211	0.5367
1.67	0.5297	0.5219	0.5375
2.67	0.5215	0.5137	0.5293
3.67	0.5276	0.5198	0.5354
4.97	0.5174	0.5096	0.5252
23.17	0.5150	0.5072	0.5228

Tabla A-2 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido
Blanco utilizado: cloroformo Concentración: 100 ppb

TIEMPO TRANSCURRIDO (Horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA		
	(Estudio realizado por triplicado)		
2.67	0.5948	0.5915	0.5946
3.67	0.5933	0.5935	0.5975
4.97	0.5917	0.5978	0.5946
26.92	0.6055	0.6089	0.6089

Tabla A-3 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del blanco de muestra
Blanco utilizado: cloroformo

TIEMPO TRANSCURRIDO (Horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA		
	(Estudio realizado por triplicado)		
0.58	0.0864	0.0815	0.0864
1.63	0.0719	0.0745	0.0769
2.67	0.0656	0.0667	0.0645
3.67	0.0650	0.0656	0.0636
4.97	0.0618	0.0667	0.0678
23.17	0.1051	0.1067	0.1039

Tabla A-4 Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido
 Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración: 100 ppb

TEMPERATURA (°C)	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	10	0.4777	0.5027
15	0.4827	0.4972	0.4862
23	0.4659	0.4922	0.4782
30	0.4574	0.4739	0.4626
35	0.4535	0.4727	0.4629

Tabla A-5 Estudio del efecto del pH en el desarrollo del compuesto colorido
 Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración: 100 ppb

pH	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	4.7	0.0887	0.0809
7.0	0.1695	0.1617	0.1773
8.0	0.5118	0.5040	0.5196
8.5	0.4343	0.4265	0.4421
9.0	0.4340	0.4262	0.4418
9.5	0.4462	0.4384	0.4540
10.0	0.4351	0.4273	0.4429
10.5	0.3927	0.3849	0.4005
11.0	0.3627	0.3549	0.3705
11.5	0.2717	0.2639	0.2795

Tabla A-6 Estudio del efecto de la variación en la concentración de 4-AAP
 en el desarrollo del compuesto colorido

Muestra	LECTURAS DE ABSORBANCIA Concentración de 4-aminoantipirina					
	A	B	A	B	A	B
	0.5%	0.5%	2%	2%	5%	5%
B-1	0.0104	---	0.0353	---	0.0692	---
B-2	0.0114	---	0.0335	---	0.0635	---
B-3	0.0178	---	0.0369	---	0.0649	---
MCI-1	0.0525	0.0678	0.1093	0.1465	0.1382	0.2125
MCI-2	0.0545	0.0623	0.1032	0.1445	0.1345	0.2198
MCI-3	0.0598	0.0614	0.1012	0.1478	0.1367	0.2112
MCII-1	0.1423	0.1598	0.2200	0.2589	0.2228	0.2958
MCII-2	0.1414	0.1548	0.2212	0.2545	0.2211	0.2965
MCII-3	0.1478	0.1509	0.2279	0.2578	0.2217	0.2991
MCIII-1	0.2614	0.2765	0.4172	0.4576	0.3716	0.4479
MCIII-2	0.2696	0.2736	0.4185	0.4595	0.3714	0.4465
MCIII-3	0.2675	0.2778	0.4163	0.4568	0.3717	0.4485

MCI: 20ppb, MCII: 100 ppb, MCIII: 150 ppb

Tabla A-7 Estudio del efecto de la variación en la concentración de ferricianuro de potasio en el desarrollo del compuesto colorido

Muestra	LECTURAS DE ABSORBANCIA					
	Concentración de ferricianuro de potasio					
	A 4%	B 4%	A 8%	B 8%	A 12%	B 12%
B-1	0.0442	---	0.0480	---	0.0528	---
B-2	0.0367	---	0.0441	---	0.0479	---
B-3	0.0298	---	0.0450	---	0.0461	---
MCI-1	0.0927	0.0479	0.1303	0.0740	0.1315	0.0805
MCI-2	0.0919	0.0507	0.1251	0.0645	0.1292	0.0772
MCII-1	0.3185	0.2792	0.4357	0.4088	0.4550	0.3944
MCII-2	0.3607	0.3235	0.4455	0.4198	0.4598	0.4004
MCIII-1	0.5219	0.4820	0.6569	0.6073	0.6808	0.6321
MCIII-2	0.4943	0.4721	0.6648	0.6124	0.7028	0.6538

MCI: 20ppb, MCII: 100 ppb, MCIII: 150 ppb

A=Muestras que se leyeron con el agua destilada como blanco

B=Muestras que se leyeron con el blanco de muestra

El B1 se utilizó para leer las muestras de CI, el B2 para los de CII y el B3 para los de CIII.

B) Método sin extracción

Tabla B-1 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Blanco utilizado: agua purificada Concentración de fenol: 5 ppm

TIEMPO TRANSCURRIDO		LECTURAS DE ABSORBANCIA				
(horas)	(Estudio realizado por quintuplicado)					
0.25	0.8838	0.8895	0.9048	0.9061	0.8927	
0.50	0.8823	0.8829	0.9008	0.9040	0.8877	
0.75	0.8690	0.8740	0.8934	0.8970	0.8831	
1.00	0.8690	0.8729	0.8888	0.8957	0.8779	
1.50	0.8598	0.8697	0.8895	0.8902	0.8765	
2.50	0.8360	0.8474	0.8759	0.8730	0.8611	
4.00	0.8063	0.8201	0.8519	0.8533	0.8377	
6.00	0.7713	0.7876	0.8306	0.8236	0.8185	
7.50	0.7371	0.7553	0.8073	0.7990	0.7957	

Tabla B-2 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración de fenol: 5 ppm

TIEMPO TRANSCURRIDO		LECTURAS DE ABSORBANCIA				
(horas)	(Estudio realizado por quintuplicado)					
0.25	0.8749	0.8805	0.8975	0.8983	0.8842	
0.50	0.8712	0.8780	0.8929	0.8973	0.8834	
0.75	0.8668	0.8720	0.8890	0.8948	0.8801	
1.00	0.8594	0.8676	0.8895	0.8907	0.8780	
1.50	0.8574	0.8641	0.8825	0.8864	0.8710	
2.50	0.8283	0.8420	0.8657	0.8680	0.8532	
4.00	0.8050	0.8160	0.8516	0.8494	0.8354	
6.00	0.7654	0.7823	0.8244	0.8166	0.8074	
7.50	0.7249	0.7475	0.7950	0.7879	0.7805	

Tabla B-2 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad de blanco de muestra

Blanco utilizado: agua purificada

TIEMPO TRANSCURRIDO		LECTURAS DE ABSORBANCIA		
(horas)	(Estudio realizado por triplicado)			
0.25	0.0041	0.0024	0.0073	
0.50	0.0052	0.0049	0.0065	
0.75	0.0041	0.0041	0.0042	
1.00	0.0045	0.0048	0.0051	
1.50	0.0035	0.0049	0.0043	
2.50	0.0023	0.0058	0.0029	
4.00	0.0064	0.0029	0.0030	
6.00	0.0041	0.0032	0.0042	
7.50	0.0126	0.0057	0.0073	

Tabla B-4. Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido
 Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración de fenol: 5ppm

TEMPERATURA (°C)	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	10	0.8173	0.8104
15	0.8164	0.8110	0.8016
20	0.8157	0.8099	0.8012
25	0.8241	0.8105	0.8022
30	0.8125	0.8072	0.7990
35	0.8084	0.8055	0.7980

Tabla B-5. Estudio del efecto del pH en el desarrollo del compuesto colorido
 Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración de fenol: 5ppm

pH	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	5.64	0.4791	0.4691
7.05	0.4796	0.4652	0.4925
8.12	0.8391	0.8212	0.8479
9.05	0.6853	0.6759	0.6901
9.50	0.6838	0.6767	0.6929
9.80	0.6818	0.6718	0.6935
10.01	0.6774	0.6698	0.6899
10.20	0.6748	0.6600	0.6827
10.50	0.6629	0.6547	0.6728
11.00	0.6140	0.6076	0.6212
11.75	0.3330	0.3225	0.3489

Tabla B-6 Estudio del efecto de la variación en [4-AAP] en el desarrollo del compuesto colorido

Muestra	LECTURAS DE ABSORBANCIA					
	Concentración de 4-aminoantipirina					
	A 0.5%	B 0.5%	A 2%	B 2%	A 5%	B 5%
B-1	0.0010	---	0.0078	---	0.0130	---
B-2	0.0008	---	0.0070	---	0.0145	---
B-3	0.0015	---	0.0081	---	0.0125	---
MCI-1	0.2660	0.2614	0.2740	0.2713	0.2584	0.2415
MCI-2	0.2625	0.2678	0.2798	0.2745	0.2545	0.2469
MCI-3	0.2678	0.2698	0.2732	0.2769	0.2569	0.2467
MCII-1	1.0268	1.0246	1.0854	1.0853	1.0956	1.0831
MCII-2	1.0269	1.0268	1.0801	1.0845	1.0989	1.0814
MCII-3	1.0267	1.0287	1.0845	1.0860	1.0982	1.0835
MCIII-1	1.8266	1.8229	2.0426	2.0377	2.0139	1.9645
MCIII-2	1.8260	1.8278	2.0428	2.0345	2.0135	1.9647
MCIII-3	1.8249	1.8269	2.0418	2.0312	2.0169	1.9639

Tabla B-7. Estudio del efecto de la variación en la concentración de ferricianuro de potasio en el desarrollo del compuesto colorido

Muestra	LECTURAS DE ABSORBANCIA					
	Concentración de ferricianuro de potasio					
	A 4%	B 4%	A 8%	B 8%	A 12%	B 12%
B-1	0.0019		0.0013		0.0015	
B-2	0.0012		0.0011		0.0013	
B-3	0.0014		0.0017		0.0021	
MCI-1	0.1768	0.1789	0.2606	0.2568	0.2629	0.2592
MCI-2	0.1954	0.1963	0.2588	0.2582	0.2626	0.2602
MCI-3	0.1853	0.1876	0.2602	0.2579	0.2598	0.2572
MCII-1	0.9141	0.9287	1.3411	1.3346	1.3439	1.3395
MCII-2	0.9500	0.9641	1.3459	1.3411	1.3428	1.3386
MCII-3	0.9315	0.9450	1.3326	1.3253	1.3427	1.3383
MCIII-1	1.4470	1.4584	1.9981	1.9940	2.0128	2.0015
MCIII-2	1.5466	1.5534	1.9924	1.9886	2.0111	2.0013
MCIII-3	1.5242	1.5304	1.9877	1.9831	2.0126	2.0022

Para los dos últimos estudios:

B: Blanco de muestra, MCI: 2ppm, MCII: 10 ppm, MCIII: 15ppm
1,2 Y 3 se refieren a réplicas

A=Muestras que se leyeron con el agua destilada como blanco

B=Muestras que se leyeron con el blanco de muestra

El B1 se utilizó para leer los valores de CI, el B2 para los de CII y el B3 para los de CIII.

2. METODO ESPECTROFOTOMETRICO DEL MBTH

C) Método con extracción

Tabla C-1 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Blanco utilizado: cloroformo		Concentración de fenol: 40 ppb		
Tiempo transcurrido (horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA			
	(Estudio realizado por triplicado)			
0.25	0.2284	0.2260	0.1386	
0.50	0.2432	0.2115	0.1404	
0.75	0.2354	0.2111	0.1442	
1.00	0.2384	0.2278	0.1508	
1.25	0.2406	0.2224	0.1429	
1.75	0.2335	0.2214	0.1520	
2.75	0.2297	0.2207	0.1485	
3.75	0.2009	0.1968	0.1259	
4.75	0.2179	0.2076	0.1452	
5.75	0.2081	0.2058	0.1420	
25.25	0.2023	0.1865	0.1174	

Tabla C-2 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido

Blanco utilizado: blanco de muestra		Concentración de fenol: 40 ppb		
Tiempo transcurrido (horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA			
	(Estudio realizado por triplicado)			
0.25	0.1852	0.1768	0.1091	
0.50	0.1798	0.1599	0.0973	
0.75	0.2178	0.1814	0.1135	
1.00	0.2222	0.1833	0.1193	
1.25	0.2044	0.2067	0.1385	
1.75	0.2425	0.2191	0.1569	
2.75	0.2041	0.1850	0.1205	
3.75	0.2162	0.1880	0.1265	
4.75	0.1863	0.1993	0.1235	
5.75	0.1729	0.1836	0.1059	
25.25	0.1998	0.1968	0.1213	

Tabla C-3 Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del blanco de muestra

Blanco utilizado: cloroformo		LECTURAS DE ABSORBANCIA		
Tiempo transcurrido (horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA			
	(Estudio realizado por triplicado)			
3.75	-0.0260	0.0519	0.0072	
4.75	-0.0050	0.0176	-0.0010	
5.75	0.0319	0.0299	-0.0060	
25.25	-0.0270	-0.0280	0.0048	

Tabla C-4. Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido

Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración de fenol: 50 ppb

TEMPERATURA (°C)	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	10	0.2301	0.2141
15	0.2588	0.2416	0.2387
22.5	0.2293	0.2136	0.2079
30	0.2223	0.2083	0.2005
35	0.2122	0.2078	0.2620

Tabla C-5. Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del compuesto colorido

Blanco utilizado: cloroformo Concentración de fenol: 50 ppb

TEMPERATURA (°C)	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	10	0.2605	0.2366
15	0.2462	0.2356	0.2205
22.5	0.2426	0.2289	0.2233
30	0.2395	0.2212	0.2073
35	0.2420	0.2214	0.2243

Tabla C-6. Estudio del efecto de la temperatura en el desarrollo del blanco de muestra

Blanco utilizado: cloroformo

TEMPERATURA (°C)	LECTURAS DE ABSORBANCIA (Estudio realizado por triplicado)		
	10	0.0525	0.0185
15	0.0135	0.0100	0.0082
22.5	0.0100	-0.0060	0.0098
30	0.0038	0.0178	0.0225
35	0.0106	0.0165	0.0168

Tabla C-7. Estudio del efecto de la variación en la concentración de MBTH en el desarrollo del compuesto colorido

Muestra	LECTURAS DE ABSORBANCIA		
	Concentración de MBTH (%)		
	A	A	A
	0.0375	0.05	0.0625
B-1	0.0092	0.0053	0.0073
B-2	0.0069	0.008	0.0055
MCI-1	0.0649	0.0454	0.0564
MCI-2	0.0595	0.0474	0.0659
MCIII-1	0.2678	0.2205	0.2478
MCIII-2	0.2661	0.2221	0.2535

MCI: 10 ppb y MCIII: 50 ppb

A=Muestras que se leyeron con cloroformo como blanco.

Tabla C-7. Estudio del efecto de la variación en la concentración de sulfato amonocérico en el desarrollo del compuesto colorido

LECTURAS DE ABSORBANCIA			
Concentración de sulfato amonocérico (%)			
Muestra	A	A	A
	0.75%	1%	1.25%
B-1	0.005	0.0077	0.0
B-2	0.0073	0.008	0.0104
MCI-1	0.0510	0.0429	0.0548
MCI-2	0.0545	0.0454	0.0504
MCIII-1	0.2294	0.2219	0.23
MCIII-2	0.2241	0.2205	0.2114

MCI: 10 ppb y MCIII: 50 ppb

A=Muestras que se leyeron con cloroformo como blanco.

D) Método sin extracción

Tabla D-1. Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido
Blanco utilizado: agua purificada Concentración de fenol: 1 ppm

Tiempo transcurrido (horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA				
	(Estudio realizado por quintuplicado)				
0.25	0.1830	0.1895	0.1780	0.2005	0.1914
0.50	0.1739	0.1881	0.1785	0.2005	0.1939
0.75	0.1811	0.1903	0.1791	0.1940	0.1923
1.00	0.1664	0.1918	0.1787	0.1997	0.1939
1.25	0.1726	0.1881	0.1799	0.2017	0.1925
1.75	0.1715	0.1879	0.1777	0.1973	0.1930
2.25	0.1746	0.1879	0.1770	0.1996	0.1922
3.25	0.1664	0.1823	0.1725	0.1932	0.1858
4.25	0.1647	0.1897	0.1730	0.1954	0.1885
5.25	0.1612	0.1837	0.1695	0.1916	0.1828
6.25	0.1705	0.1897	0.1699	0.1934	0.1959
8.75	0.1618	0.1863	0.1681	0.1923	0.1884

Tabla D-2. Estudio del efecto del transcurso del tiempo en la estabilidad del compuesto colorido
Blanco utilizado: blanco de muestra Concentración de fenol: 1 ppm

Tiempo transcurrido (horas)	LECTURAS DE ABSORBANCIA				
	(Estudio realizado por quintuplicado)				
0.25	0.1593	0.1675	0.1555	0.1717	0.1690
0.50	0.1507	0.1671	0.1558	0.1715	0.1683
0.75	0.1481	0.1669	0.1546	0.1755	0.1694
1.00	0.1536	0.1635	0.1545	0.1745	0.1674
1.25	0.1455	0.1684	0.1561	0.1783	0.1715
1.75	0.1501	0.1639	0.1528	0.1733	0.1675
2.25	0.1486	0.1663	0.1521	0.1704	0.1667
3.25	0.1567	0.1621	0.1526	0.1738	0.1663
4.25	0.1485	0.1624	0.1506	0.1652	0.1651
5.25	0.1469	0.1622	0.1495	0.1705	0.1637
6.25	0.1344	0.1584	0.1398	0.1666	0.1599
8.75	0.1391	0.1571	0.1384	0.1664	0.1596

Tabla D-5 Estudio del efecto de la variación en la concentración de MBTH en el desarrollo del compuesto colorido

LECTURAS DE ABSORBANCIA						
Concentración de MBTH						
Muestra	A	B	A	B	A	B
	0.05%	0.05%	0.20%	0.20%	0.30%	0.30%
B-1	0.0339		0.0159		0.0145	
B-2	0.0440		0.0142		0.0128	
B-3	0.0208		0.0121		0.0109	
MCI-1	0.0350	0.0022	0.0677	0.0514	0.0615	0.0465
MCI-2	0.0360	0.0019	0.0682	0.0513	0.0617	0.0471
MCI-3	0.0360	0.0019	0.0670	0.0510	0.0623	0.0467
MCII-1	0.0555	0.0109	0.1316	0.1169	0.1226	0.1094
MCII-2	0.0589	0.0148	0.1332	0.1190	0.1217	0.1088
MCII-3	0.0588	0.0148	0.1191	0.1055	0.1228	0.1100
MCIII-1	0.0970	0.0755	0.2193	0.2061	0.2064	0.1935
MCIII-2	0.1035	0.0823	0.2152	0.2020	0.2085	0.1954
MCIII-3	0.1006	0.0788	0.2000	0.1871	0.1965	0.1838

MCI: 0.2ppm, MCII: 0.5ppm, MCIII: 1 ppm

A=Muestras que se leyeron con el agua purificada como blanco

B=Muestras que se leyeron con el blanco de muestra

Tabla D-6 Estudio del efecto de la variación en la concentración de sulfato amonocérico en el desarrollo del compuesto colorido

LECTURAS DE ABSORBANCIA						
Concentración de sulfato amonocérico						
Muestra	A	B	A	B	A	B
	0.50%	0.50%	1%	1%	1.50%	1.50%
B-1	0.0067		0.0116		0.0293	
B-2	0.0068		0.0133		0.0264	
B-3	0.0075		0.0116		0.0207	
MCI-1	0.0440	0.0364	0.0673	0.0560	0.0824	0.0528
MCI-2	0.0439	0.0361	0.0691	0.0575	0.0859	0.0564
MCI-3	0.0474	0.0394	0.0657	0.054	0.0824	0.0528
MCII-1	0.0935	0.0851	0.134	0.1207	0.1523	0.1253
MCII-2	0.089	0.0809	0.1348	0.1211	0.1529	0.1268
MCII-3	0.0896	0.0814	0.1247	0.1117	0.1527	0.1256
MCIII-1	0.1342	0.1256	0.234	0.2206	0.2679	0.2467
MCIII-2	0.1812	0.1725	0.2294	0.2158	0.2604	0.2395
MCIII-3	0.1774	0.1683	0.2098	0.1969	0.2654	0.2452

MCI: 0.2ppm, MCII: 0.5ppm, MCIII: 1 ppm

A=Muestras que se leyeron con el agua purificada como blanco

B=Muestras que se leyeron con el blanco de muestra

ANEXO V. Cálculo de la precisión

V.1 Método Espectrofotométrico de la 4-AAP con extracción

MUESTRA	LECTURA 1 (ppb)	LECTURA 2 (ppb)	AMPLITUD (ppb)	PROMEDIO LECTURAS
1	119.022	117.511	1.511	118.266
2	105.496	111.803	6.307	108.650
3	111.803	108.446	3.357	110.125
4	105.496	108.446	2.950	106.971
5	91.803	94.441	2.638	93.122
6	98.254	100.604	2.350	99.429
7	95.952	96.671	0.719	96.312
8	87.223	88.038	0.815	87.631
9	81.372	88.038	6.667	84.705
10	87.223	81.372	5.851	84.297
11	106.360	106.456	0.096	106.408
12	93.314	95.185	1.871	94.249
13	93.266	95.185	1.918	94.225
14	103.962	103.314	0.647	103.638

suma 37.698 ppb

R = 2.693
 Precisión: $s = R/1.128 = \underline{2.387}$ ppb

Lectura promedio global = 99.145 ppb
 Precisión relativa = $\underline{2.41}$ %

La precisión relativa se calcula a partir de la siguiente relación:

$$\text{Precisión relativa} = \text{precisión/lectura promedio global} * 100$$

ANEXO V

V.2 Método Espectrofotométrico de la 4-AAP sin extracción

MUESTRA	LECTURA 1 (ppm)	LECTURA 2 (ppm)	AMPLITUD (ppm)	PROMEDIO LECTURAS
1	6.720	6.763	0.043	6.741
2	6.880	6.890	0.010	6.885
3	6.787	6.763	0.024	6.775
4	6.824	6.830	0.006	6.827
5	6.694	6.723	0.028	6.709
6	6.156	6.201	0.044	6.178
7	8.255	8.249	0.006	8.252
8	5.030	5.035	0.005	5.032
9	5.035	5.036	0.001	5.036
10	5.030	5.036	0.006	5.033

suma 0.175 ppm

$R = 0.017$
 Precisión : $s = R/1.128 = \underline{0.015}$ ppm
 Lectura promedio global = 6.347 ppm
 Precisión relativa = 0.24 %

V.3 Método Espectrofotométrico del MBTH con extracción

MUESTRA	LECTURA 1 (ppb)	LECTURA 2 (ppb)	AMPLITUD (ppb)	PROMEDIO LECTURAS
1	46.580	46.088	0.224	46.334
2	37.932	36.006	0.167	36.969
3	46.764	43.547	0.198	45.156
4	43.547	42.318	0.202	42.932
5	46.682	45.535	0.218	46.109
6	44.961	45.289	0.221	45.125
7	45.248	45.289	0.222	45.268
8	44.961	45.248	0.221	45.105
9	45.289	44.961	0.219	45.125
10	38.773	39.018	0.190	38.895
11	39.018	40.166	0.192	39.592
12	40.166	38.773	0.184	39.469
13	41.846	38.732	0.175	40.289
14	38.855	37.297	0.176	38.076
15	37.297	36.867	0.179	37.082

suma 2.985 ppb

$R = 0.199$
 Precisión: $s = R/1.128 = \underline{0.176}$ ppb
 Lectura promedio global = 42.102 ppb
 Precisión relativa = 0.42 %

V.4 Método Espectrofotométrico del MBTH sin extracción

MUESTRA	LECTURA 1 (ppm)	LECTURA 2 (ppm)	AMPLITUD (ppm)	PROMEDIO LECTURAS
1	0.768	0.747	0.020	0.758
2	0.770	0.780	0.010	0.775
3	0.541	0.552	0.011	0.547
4	0.561	0.563	0.002	0.562
5	0.561	0.513	0.048	0.537
6	0.558	0.550	0.007	0.554
7	0.550	0.549	0.001	0.549
8	0.544	0.536	0.008	0.540
9	0.536	0.518	0.018	0.527
10	0.536	0.518	0.018	0.527
11	0.518	0.544	0.026	0.531

suma 0.171 ppm

$R = 0.016$
 Precisión : $s = R/1.128 = \underline{0.014}$ ppm
 Lectura promedio global = 0.582 ppm
 Precisión relativa = 2.36 %

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. American Petroleum Institute, Manual of disposal of refinery wastes, Vol. IV, Sampling and analysis of waste water, 6ª Ed., 1957, USA
2. *Analyst Subject Index*. 1993, 118, 29.
3. *Analytical Abstract Subject Index*. 1990, 52, S111,S154.
4. *Analytical Abstract Subject Index*. 1991, 53, S170-171, S235.
5. *Analytical Abstract Subject Index*. 1992, 54, S218-219, S298-S299.
6. *Analytical Abstract Subject Index*. 1993, 55, S232, S2323.
7. *Analytical Abstract Subject Index*. 1994, 56, S180-181, S254.
8. *Analytical Abstract Subject Index*. 1995, 57, S183-184, S256-257.
9. Analytical Methods Committee, Principles of data quality control in chemical analysis, *Analyst*. 1989, 114, 1497-1503.
10. ASTM D 2777-86. Standard practice for determination of precision and bias of applicable methods of committee D-19 on water.
11. ASTM D 1783-87. Standard test methods for phenolic compounds in water.
12. ASTM E 60-87. Standard practice for photometric and spectrophotometric methods for chemical analysis of metals.
13. ASTM E 169-87. Standard practices for general techniques of ultraviolet-visible quantitative analysis.
14. ASTM E 177-90a. Standard practice for use of the terms precision and bias for ASTM test methods.
15. ASTM D 3856-88. Standard guide for good laboratory practices in laboratories engaged in sampling and analysis of water.
16. ASTM D 2380-89. Standard test method for phenols in water by Gas-Liquid Chromatography.
17. ASTM D 3694-89. Standard practices for preparation of sample containers and for preservation of organic constituents.
18. ASTM D 4210-89. Standard practice for intralaboratory quality control procedures and a discussion on reporting low-level data.

19. ASTM E 876-89. Standard practice for use of statistics in the evaluation of spectrometric data.
20. ASTM E 135-90b. Standard terminology relating to analytical atomic spectroscopy.
21. Benfenati, E., G. Facchini, P. Pierucci and R. Fenelli, Identification of organic contaminants in leachates from industrial waste landfills, *Trends in Analytical Chemistry*. 1996, 15, 305-310.
22. Chemical Safety, Data Sheets, Col. 4b, Toxic Chemicals, *Royal Society of Chemistry*. 1991, 116-121.
23. CE-CCA 001/89. Criterios Ecológicos, Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de la calidad del agua, Diario Oficial de la Federación, 13 de diciembre de 1989.
24. Dux, J.P., Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory, *Van Nostrand Reinhold Company*. 2a Ed., Chapman and Hall, 1991, USA.
25. Emerson, E., H.H. Beacham y L. D. Beegle, The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds. *J. Org. Chem.*. 1943, 8, 417-428.
26. Encyclopedia of Chemical Technology, *Kirk-Othmer*. 1991, 18, 4^a Ed., John Wiley and Sons, USA.
27. Encyclopedia of Science and Technology, 1992, Tomo 13, 7^a Ed., McGraw-Hill Inc. USA.
28. EPA-600/4-79-020 - Methods for chemical analysis of water and wastes, phenolics, Total Recoverable - Method 420.1 - Spectrophotometric, Manual 4-AAP with Distillation.
29. EPA-40 CFR Part 136, Federal Register, Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants under the clean water act, Rules and Regulations. 1984, 49, 198-199.
30. EPA SW-846, 1986, Vol. IB, 3^a Ed.
31. Ettinger, M.B., C.C. Ruchhoft y R.J. Lishka, Sensitive 4-aminoantipyrine method for phenolic compounds. *Anal. Chem.*, 1951, 23, 1783-1788.
32. Faust, S. D. y E.W. Mikulewicz, Factors influencing the condensation of 4-aminoantipyrine with derivatives of hydroxybenzene - II. Influence of hydronium

- ion concentration on absorptivity, *Water Research*, Pergamon Press. **1967**, *1*, 509-522.
33. Friestad, H. O., D. E. Ott y F.A. Gunther, Automated colorimetric microdetermination of phenol by oxidative coupling with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 1750-1754.
 34. Gales, M.E., An evaluation of the 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone method for determination of phenols in water and wastewater, *Analyst.* **1975**, *100*, 841-847.
 35. Gordon, G. E., Colorimetric determination of phenol, *The Analyst.* **1960**, *85*, 278-281.
 36. Gottlieb S. y P.B. Marsh, Quantitative determination of phenolic fungicides, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1946**, *18*, 16-19.
 37. Goulden, P. D., P. Brooksbank y M. B. Day, Determination of submicrogram levels of phenol in water, *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 2430-2433.
 38. Hauser, T. R. y R.L. Cummins, Increasing sensitivity of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone test for analysis of aliphatic aldehydes in air, *Analyt. Chem.* **1994**, *36*, 679-681.
 39. Hünig, S. y K.H. Fritsch, Azofarbstoffe durch oxydative kupplung I. Farbstoffe aus N-methyl-benzthiazolon-hydraxon, *Ann. Chem.* **1957**, Bd. 609, 143-161.
 40. Hünig, S. y H. Balli, Azofarbstoffe durch oxydative kupplung, X. Kupplungsaktivität heterocyclischer N-methyl-2-hydrazone gegenüber phenol, *Ann. Chem.* **1959**, Bd. 628, 57-68.
 41. ISO 6439: 1990 (E) - Water Quality - Determination of phenol index - 4-aminoantipyrine spectrometric methods after distillation.
 42. Jones, P.F. y K.E. Johnson, Estimation of phenols by the 4-aminoantipyrine method: identification of the colored reaction products by proton magnetic resonance spectroscopy, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 2860-2868.
 43. Kamata, E., Spot tests for phenol derivatives with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, *Nippon Kagaku Zasshi*, **1966**, Vol. 87, No. 4, 380-381; *Chem. Abstr.* **1966**, *65*, 16052a.
 44. Keith, L.H. et al, Principles of environmental analysis, *Anal. Chem.*, **1983**, *55*, 2210-2218.
 45. Lange's Handbook of Chemistry, John A. Dean, **1972**, Mc Graw-Hill Book Company, USA.

46. Martin, R. W., Rapid colorimetric estimation of phenol, *Anal. Chem.* **1949**, *21*, 1419-1420.
47. McMurry, John, Química Orgánica, Grupo Editorial Iberoamérica, **1994**, 3ª. Ed. 987-998, México.
48. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales, APHA, AWWA, WPCF, **1995**, 18ª Ed., España, Ed. Díaz de Santos, 1.1-1.33, 5.56-5.63, 6.148-6.158.
49. Miller, J. C. y J. N. Miller, Estadística para química analítica, **1993**, 2ª Ed., Addison-Wesley Iberoamericana.
50. Mohler, E. F. y L. N. Jacob, Determination of phenolic-type compounds in water and industrial waste waters: Comparison of analytical methods, *Anal. Chem.*, **1957**, *29*, 1369-1374.
51. NMX-AA-50-1981, Análisis de agua - Determinación de fenoles. Diario Oficial de la Federación, 15 de febrero de 1982, Dirección General de Normas, SECOFI (México).
52. NOM-127-SSA1-1994, Secretaría de Salud, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano - Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
53. Diario Oficial de la Federación, 18 de octubre de 1993.
54. Ochynski, F. W., The absorptiometric determination of phenol, *The Analyst.* **1960**, *85*, 278-281.
55. Puig, D. y D. Barceló, Determination of phenolic compounds in water and waste water, *Trend in Analytical Chemistry.* **1996**, *15*, 362-374.
56. RELE (Red Española de Laboratorios de Ensayos), Guía para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos químicos, G-CSQ-01, Rev. 1, Diciembre 1992.
57. Sawicki, E., T.R. Hauser, T. W. Stanley y W. Elbert, The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test, Sensitive new methods for the detection, rapid estimation, and determination of aliphatic aldehydes, *Anal. Chem.* **1961**, *33*, 93-96.
58. Sax, N. Irving, Dangerous properties of industrial materials, **1984**, 6ª Ed., Van Nostrand Reinhold, Canada.

59. Scott, R. D., Application of a bromine method in determination of phenol and cresols, *Industrial and Engineering Chemistry*. **1931**, 3, 67-70.
60. Shaw, J. A., Determination of phenols in aqueous wastes from coke plants, *Anal. Chem.* **1951**, 23, 1788-1792.
61. Skoog, Douglas, West, Donald M., Análisis Instrumental, **1989**, 2ª Ed., McGraw Hill, México, 107-121, 158-163, 197, 200-201.
62. Skoog, Douglas, West, Donald M., Química Analítica, **1986**, 4ª Ed., Nueva Editorial Interamericana, México, 440-483.
63. Snell F. D., L. S. Ettre, Eds., Encyclopedia of industrial chemical analysis, Wiley, 1973, Vol. 17, p. 1-50: Phenols.
64. Straub, C. P., Practical handbook of environmental Control, **1990**, 2ª Ed., CRC Press Ind, USA.
65. Taylor, J. K., Quality assurance of chemical measurements, Lewis, 1990, USA.
66. Taylor, J. K., Validation of analytical methods, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 600A-608A.
67. The Water Encyclopedia, Frits van der Leeden, Fred L. Troise, David Keith Todd, Lewis Publishers, **1990**, 2ª Ed., USA.
68. Thompson, M. y T. F., What exactly is fitness for purpose in analytical Measurement?, *Analyst*. **1996**, 121, 275-278.
69. Umeda, M., Color reactions of phenols. III. Color reactions of phenols with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and cerium ammonium sulfate and its application to colorimetric determination of phenol, *Yakugaku Zasshi*. **1963**, 83, 951-956; *Chem. Abstr.* **1964**, 60, 11384b.
70. Willard, H.H., L.L Merritt, Jr J.A. Dean y Jr F.A. Settle, Métodos Instrumentales de Análisis, Grupo Editorial Iberoamericana, México, **1991**, 7ª. Ed., 97-98, 160-161, 166-168.
71. Wilson, A. L., The performance characteristics of analytical methods - I, *Talanta*, Pergamon Press. **1970**, 17, 21-29.
72. Wilson, A. L., The performance characteristics of analytical methods - III, *Talanta*, Pergamon Press. **1973**, 20, 725-732.
73. Wilson, A. L., The performance characteristics of analytical methods - IV, *Talanta*, Pergamon Press. **1974**, 21, 1109-1121.