



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR ANÁLISIS EN FLUJO
CONTINUO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. ADRIANA ISABEL CHABLE CORTEZ

DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidenta: Dra. María del Carmen Durán Domínguez

Secretaria: Dra. Ana Lilia Ocampo Flores

Vocal: Dra. Rosa María Ramírez Zamora

Vocal: Dra. María Teresa Ramírez Silva

Vocal: Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar

Lugar donde se desarrolló la tesis

Laboratorio 211 del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutora de la tesis:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

Contenido

Símbolos y abreviaturas	4
Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	9
2. Marco teórico	11
2.1 Contaminación de aguas residuales por fenoles	11
2.2 Determinación de contaminantes a concentraciones traza en agua.....	12
2.3 Análisis por inyección en flujo	13
2.4 Determinación de fenoles en agua.....	15
2.5 Determinación de fenoles por extracción en fase sólida acoplada a <i>FIA</i>	24
3. Objetivos	34
General.....	34
Específicos	34
4. Metodología	35
4.1 Reactivos y disoluciones	35
4.2 Instrumentación	35
4.2.1 Configuración para la determinación de fenoles totales por <i>FIA</i>	36
4.2.2 Metodología para el empacado de la columna de Amberlita XAD-4	37
4.2.3 Metodología para el empacado de la columna de <i>Lichrolut EN</i>	37
4.2.4 Preconcentración de fenoles por SPE en línea	38
4.3 Tratamiento de datos	39
4.3.1 Diseño de experimentos para optimización de la preconcentración	39
4.3.2 Repetibilidad y reproducibilidad.....	39
4.3.3 Límites de detección y cuantificación	40
4.4 Disposición de los residuos generados en esta investigación	40
5. Resultados y discusiones	41

Contenido

5.1 Evaluación de la configuración <i>FIA</i>	41
5.1.1 Determinación del pH óptimo para la determinación de fenoles totales.....	41
5.1.2 Influencia de la concentración de la disolución amortiguadora amoniaca de pH 9.....	42
5.2 Evaluación de la preconcentración de fenol en una columna de Amberlita XAD-4.	44
5.2.1 Búsqueda de las mejores condiciones de preconcentración	44
5.2.1.1 Diseño 1: experimento factorial fraccionado 2^{4-1}	44
5.2.1.2 Mejor volumen de elución para columna de 11 cm	46
5.2.2.3 Diseño 2: factorial fraccionado 2^{4-1} sin réplicas.....	47
5.2.2.4 Diseño 3: experimento factorial 2^3 con columna de 11 cm.....	49
5.2.2.5 Volumen de fuga para la columna de 11 cm.....	50
5.2.3 Preconcentración de compuestos fenólicos a diferentes concentraciones iniciales	51
5.3 Evaluación de la preconcentración de fenoles con <i>Lichrolut EN</i>	54
5.3.1 Determinación de composición del eluyente.....	54
5.3.2 Determinación de fenol por <i>FIA</i> con el eluyente modificado	55
5.3.3 Límites de detección y cuantificación	59
5.3.4 Repetibilidad y reproducibilidad de la determinación de fenol y 2-clorofenol por <i>FIA</i>	60
5.3.5 Mejores condiciones para la preconcentración de fenol con <i>Lichrolut EN</i>	61
5.3.5.1 Diseño 1: factorial fraccionado 2^{4-1} sin réplicas.....	61
5.3.5.2 Diseño 2: factorial 2^2 duplicado con un punto central.....	63
5.3.5.3 Diseño 3: factorial 2^2 triplicado con un punto central.....	65
5.3.5.4 Diseño 4: factorial 2^2 duplicado con un punto central.....	67
5.3.5.5 Estudio del volumen de elución	70
5.3.6 Estudio de la preconcentración de fenol y 2-clorofenol con <i>Lichrolut EN</i>	71
6. Conclusiones.....	76
7. Perspectivas a futuro	78
8. Referencias	79
Anexo 1. Análisis de varianza [39].....	84
Anexo 2. Rectas de regresión ponderadas [39].....	89

Anexo 3. Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación 93

Símbolos y abreviaturas

<i>A</i>	Área de pico
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza, por sus siglas en inglés
<i>B</i>	Baño con control de temperatura (Figura 13)
<i>BP</i>	Bomba peristáltica (Figura 16)
<i>C</i>	Fluido acarreador (Figura 3, Figura 4, Figura 8, Figura 11, Figura 12), columna de extracción en fase sólida (Figura 16), celda de flujo (Figura 7)
<i>CG</i>	Cromatografía de gases
<i>CL</i>	Cromatografía de líquidos
<i>CM</i>	Cuadrado medio
<i>CP</i>	Puerto cerrado, por sus siglas en inglés (Figura 14)
<i>C18</i>	Octadecilsilano
<i>D</i> o <i>FC</i>	Espectrofotómetro o detector con celda de flujo
<i>DER</i>	Desviación estándar relativa
<i>d.i.</i>	Diámetro interno
<i>E</i>	Eluato (Figura 16)
<i>E, EL</i>	Eluyente (Figura 11, Figura 14)
<i>EC</i>	Columna de extracción, por sus siglas en inglés (Figura 12, Figura 14)
<i>F</i>	<i>F</i> de Fisher
<i>FIA</i>	Análisis por inyección en flujo, por sus siglas en inglés
<i>GI</i>	Grados de libertad
<i>H</i>	Altura de pico
<i>h</i>	Número de muestras en el análisis de varianza de un factor
<i>HC</i>	Bucle de espera, por sus siglas en inglés (Figura 12)
<i>HP</i>	Bomba de alta presión, por sus siglas en inglés (Figura 14)
<i>HPLC-DAD</i>	Cromatografía de líquidos de alta presión acoplada a detección con arreglo de diodos, por sus siglas en inglés
<i>HV</i>	Alto voltaje, por sus siglas en inglés (Figura 7)
<i>ISPE</i>	Extracción en fases inmunosorbentes, por sus siglas en inglés
<i>IV</i>	Válvula de inyección, por sus siglas en inglés
<i>K_{ow}</i>	Coefficiente de partición octanol-agua
<i>K_D</i>	Coefficiente de distribución
<i>K_p</i>	Coefficiente de partición
<i>K_{ad}</i>	Coefficiente de adsorción

Símbolos y abreviaturas

Li	Tubo conector, conexiones de PTFE (Figura 12, Figura 14)
LD ₅₀	Dosis letal media, por sus siglas en inglés
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
μ	Media aritmética de una población
M	Muestra (Figura 16)
MC	Análisis en flujo multiconmutado, por sus siglas en inglés. Bucle de mezclado (Figura 11), columna cromatográfica monolítica (Figura 14)
MeOH	Metanol
MIP	Polímeros de impresión molecular, por sus siglas en inglés
MS	Multijeringa, en inglés (Figura 12)
MSFIA	Inyección en flujo multijeringa, por sus siglas en inglés
n	Tamaño muestral
n_j	Número de réplicas por día
P, Pi	Bomba peristáltica (Figura 10, Figura 11)
PC	Computadora personal (Figura 7)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEEK	Polietercetona, por sus siglas en inglés
PFA	Resina de copolímero de perfluoroalcóxido, por sus siglas en inglés
PIFr	Pervaporación con inyección en flujo reverso
pK_a	Cologaritmo de la constante de acidez
PMT	Tubo fotomultiplicador, por sus siglas en inglés
PTFE	Politetrafluoroetileno
QL	Quimioluminiscencia
R, R1, R2	Reactivo (Figura 3, Figura 4, Figura 7, Figura 8, Figura 11, Figura 12)
R^2	Coefficiente de correlación
R, RC	Espiral de reacción (Figura 8, Figura 15)
σ_0^2	Varianza
s	Desviación estándar
S	Muestra, en inglés; jeringa, en inglés.
S1, S2, S3	Puerto de inyección (Figura 1)
SC	Suma de términos cuadráticos
SIA	Análisis por inyección secuencial, por sus siglas en inglés
SIC	Cromatografía de inyección secuencia, por sus siglas en inglés

Símbolos y abreviaturas

<i>SPE</i>	Extracción en fase sólida
S^2_r	Variación entre días o repetibilidad
S^2_{WR}	Reproducibilidad dentro del laboratorio
<i>St</i>	Muestra o disolución estándar (Figura 14)
<i>ST-DVB</i>	Estireno-divinilbenceno
<i>SV</i>	Válvula solenoide, por sus siglas en inglés (Figura 14). Válvula de selección, por sus siglas en inglés (Figura 10, Figura 11)
<i>t</i>	Tiempo (Figura 10, Figura 11)
t_o	Tiempo inicial
t_b	Ancho de pico a la línea base
<i>T</i>	Tiempo de residencia (Figura 1). Confluencia (Figura 12)
<i>TCF</i>	Triclorofenol
<i>uA</i>	Unidades de absorbancia
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>UV-VIS</i>	Ultravioleta-visible
<i>V</i>	Vial para la recolección de eluatos (Figura 16)
<i>V</i>	Válvula de inyección
<i>VS</i>	Válvula solenoide (Figura 16)
<i>W, w</i>	Residuos, desechos (Figura 1, Figura 3, Figura 4, Figura 7, Figura 10, Figura 11, Figura 12, Figura 13, Figura 14)
<i>w</i>	Ancho de banda
\bar{x}	Media aritmética de una muestra
\bar{x}_h	Media aritmética de la muestra <i>h</i> l
x_{ij}	<i>j</i> -ésima medida de la <i>i</i> -ésima muestra
<i>4-AAP</i>	4-aminoantipirina

Resumen

En este trabajo se evaluó la preconcentración de fenol y 2-clorofenol por extracción en fase sólida con Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN* para su posterior determinación por análisis por inyección en flujo. Las mejores condiciones empleadas para la determinación de fenol con 4-aminoantipirina como agente derivatizante para la determinación de fenol por *FIA* se obtuvieron con amortiguador amoniacal pH 9, 0.3 M. Antes de la preconcentración se estableció como intervalo de trabajo de 0.5 a 30 mg/L para ambos fenoles, con un límite de detección de 0.075 mg/L para fenol y de 0.100 mg/L para 2-clorofenol. La precisión expresada como repetibilidad y reproducibilidad fue de 2.30 y 1.89 para fenol y 2-clorofenol de 4.72 y 4.09, respectivamente. A fin de evaluar la preconcentración se evaluados dos fases sólidas: Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*. De emplearon diversos diseños factoriales para encontrar las mejores condiciones de preconcentración. Los parámetros analíticos estudiados fueron el pH, los caudales, la composición y tipo de eluyente, la longitud de la columna y el volumen de muestra. De esta manera, los máximos recobros para la columna de 11 cm de Amberlita XAD-4 se obtuvieron al cargar 50 mL de muestra diluida en HCl 0.01 M a 2 mL/min y la elución se hacía con 500 μ L de disolución de NaOH 0.1 M a 0.5 mL/min, mientras que para la columna de 3 cm de *Lichrolut EN* los mejores recobros se obtuvieron al cargar 10 mL de muestra diluida en HCl 0.1 M a 5 mL/min y eluir con 500 μ L de una disolución de metanol 20% v/v en NaOH 0.1 M a 0.5 mL/min. Finalmente, los resultados mostraron que los mayores factores de preconcentración se obtuvieron con *Lichrolut EN*, con valores de 300. Para cuantificar la preconcentración de fenoles se construyeron curvas de calibración con estándares preparados en una disolución de metanol 20% en NaOH 0.1 M, estas curvas produjeron datos heterocedásticos, por lo que se aplicó la regresión por mínimos cuadrados ponderado. El tiempo total de análisis con el *Lichrolut EN* fue de 24 min.

Palabras clave: Fenoles, extracción en fase sólida, Amberlita XAD-4, *Lichrolut EN*, preconcentración, análisis por inyección en flujo.

Abstract

In this work, an on-line method to preconcentrate phenol and 2-chlorophenol by solid phase extraction using Amberlite XAD-4 and Lichrolut EN coupled to flow injection analysis (FIA) was evaluated. 4-aminoantipyrine (4-AAP) was used as derivatizing reagent to quantify phenols by FIA being the best conditions when a 0.3 M pH 9 ammonium buffer was used. Before the preconcentration, the found range lineal for both phenols was from 0.5 mg/L to 30 mg/L, with limits of detection of 0.075 mg/L for phenol and 0.100 mg/L for 2-chlorophenol. The precision was expressed as repetibility and reproducibility: 2.30 % and 1.89 %, respectively, for phenol, and 4.72 % and 4.09 %, for 2-chlorophenol. To evaluate the preconcentration two solid phases were studied: Lichrolut EN and Amberlite XAD-4. Several factorial designs were performed to find the best conditions of preconcentration for both phases. The analytical parameters including pH, flow-rates, eluent type, eluent concentration, length of column, and sample volume were studied. So, for a column of 11 cm of Amberlite XAD-4 maximum recovery was obtained when 50 mL of sample, diluted in a 0.01 M HCl solution, were loaded at 2 mL/min and the elution was performed with 500 μ L of a 0.1 M NaOH solution at 0.5 mL/min, whereas for a column of 3 cm of Lichrolut EN the best recoveries were obtained when 100 mL of sample, diluted in a 0.01 M HCl solution, were loaded at 5 mL/min and eluted with 500 μ L of a 20% v/v methanol:0.1 M NaOH solution at 0.5 mL/min. The results showed that Lichrolut EN was the best solid phase achieving preconcentrations of 300. To quantify the phenols preconcentration using Lichrolut EN a calibration curve was constructed using standards prepared with a 20% v/v methanol: 0.1 M NaOH solution; the obtained curve produced heteroscedastic data, therefore weighted least square regression was applied. The total time of analysis was 24 min.

Keywords: Phenols, solid phase extraction, Amberlite XAD-4, Lichrolut EN, preconcentration, flow injection analysis.

1. Introducción

Las Naciones Unidas proyectan que para el año 2025, más de dos tercios de la población global vivirán en países con serios problemas de carencia de suministros de agua potable. El incremento de la población y sus impactos relacionados continúan ejerciendo una gran presión sobre los recursos hídricos alrededor del mundo. Al mismo tiempo, el aumento de residuos municipales y agrícolas, aguas residuales y subproductos derivados de la industria, además de los efectos climáticos globales y desequilibrios ecológicos comprometen aún más la calidad del agua al igual que los procesos de desinfección utilizados [1].

La presencia de fenoles, definidos como hidroxiderivados del benceno, sus núcleos condensados y derivados, son estudiados en la mayoría de los países no solamente por el sabor y olor desagradable que imparten a los alimentos y especialmente al agua, sino por el efecto tóxico y su persistencia [2]. Estos compuestos son generados por actividades antropogénicas, en la producción de plásticos, tintas, productos farmacéuticos, plaguicidas, antioxidantes, papel y en la industria petroquímica. Por su toxicidad y las propiedades organolépticas desagradables que le confiere al agua a bajas concentraciones, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos los ha clasificado como contaminantes prioritarios [3].

Debido a esto, resulta fundamental desarrollar y validar técnicas que permitan determinar estos analitos que sean rápidas, económicas, confiables y que posibiliten cuantificarlos en concentraciones traza. Actualmente, existen diversas propuestas metodológicas para la determinación de compuestos fenólicos en aguas, que incluyen técnicas espectrofotométricas y cromatográficas. Las primeras tienen el inconveniente de ser laboriosas y necesitar mucho tiempo para el análisis de las muestras y, las segundas requieren instrumentos costosos.

Los métodos automáticos han permitido aumentar el número de muestras analizadas por unidad de tiempo. Entre los métodos más utilizados se encuentran el Análisis por Inyección en Flujo (*FIA*, por sus siglas en inglés) y el Análisis por Inyección Secuencial (*SIA*, por sus siglas en inglés) [4].

Existen muchos métodos de análisis de aguas que han sido implementados en flujo continuo, sobre todo para los analitos principales como nitratos, fosfatos, cloro residual, carbonatos, etc. También han sido desarrollado métodos de flujo continuo para determinar

Introducción

compuestos orgánicos que afectan la calidad del agua, tanto en sabor como en toxicidad. Esto ha sucedido en menor medida, ya que existen otras técnicas analíticas que se han validado para estos métodos, principalmente por cromatografía de líquidos y/o gases.

Actualmente, se pueden encontrar aplicaciones de técnicas en flujo para la determinación de fenoles, ya sea como fenoles totales o su análisis de forma individual. Con ayuda de estas técnicas, es posible disminuir de forma importante los costos, el tiempo de análisis y los residuos generados, además de que son compatibles con distintos pretratamientos que posibilitan su separación de posibles interferentes o su preconcentración a fin de obtener menores límites de detección y cuantificación [5]. Aunque hay disponibles diferentes pretratamientos, como la extracción líquido-líquido y la pervaporación, la extracción en fase sólida presenta múltiples ventajas, que se explicarán más adelante. Asimismo, la detección formando derivados incrementa la selectividad y la sensibilidad de los métodos analíticos.

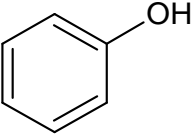
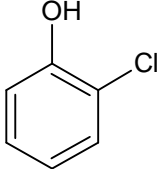
En este proyecto se desarrolló una metodología por análisis por inyección en flujo acoplado la extracción en fase sólida en línea para determinar fenoles totales en agua. Se compararon los métodos desarrollados para fenol y 2-clorofenol y se hizo una evaluación de las características de los métodos.

2. Marco teórico

2.1 Contaminación de aguas residuales por fenoles

Los fenoles son compuestos orgánicos que contienen un grupo –OH unido a un anillo aromático. Aunque la presencia de otros sustituyentes en el anillo aromático puede formar toda una serie de diversos compuestos con propiedades completamente diferentes el análisis químico de casi todos los fenoles puede llevarse a cabo de la misma forma. Esto se atribuye a la naturaleza ácida del grupo –OH del fenol y la capacidad del grupo –OH de formar derivados [6]. A fin de ejemplificar, se presentan algunas propiedades de fenol y 2-clorofenol en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Propiedades físicas y químicas de los compuestos fenólicos a estudiar [7]

	Fenol	2-clorofenol
Fórmula	C ₆ H ₅ OH	C ₆ H ₄ ClOH
Estructura		
Masa molecular	94.11	128.56
Punto de fusión (°C)	41	43
Punto de ebullición (°C)	182	217
Presión de vapor ^a (mm)	0.2	0.1
log (K _{ow}) ^b	1.46	2.17
pKa ^c	9.99	8.55
Gravedad específica	1.07	1.31
LD ₅₀ (g/kg) ^d	0.53	0.67

Ambos compuestos tienen propiedades químicas muy similares. Las principales diferencias que presentan se deben a la sustitución por Cl en el 2-clorofenol, lo cual se refleja en sus masas moleculares, puntos de ebullición, coeficientes de reparto octanol-agua, *pKa* y *LD*₅₀.

^a A 20 °C

^b Coeficiente de reparto octanol-agua

^c Cologaritmo de la constante de acidez en agua

^d Dosis letal media, dosis requerida de una sustancia para matar a la mitad de los miembros de una población de prueba en un tiempo determinado.

Sus valores de pK_a son cercanos, una propiedad común en los fenoles, debido al carácter ácido que el grupo $-OH$ les confiere.

El fenol es usado en la manufactura de resina sintéticas, colorantes, medicamentos (principalmente antisépticos y anestésicos locales), plaguicidas, agentes sintéticos de curtido (bronceado), sustancias aromáticas, aceites lubricantes, plásticos, reactivos químicos, antioxidantes y de pulpa de papel [5,8]. La presencia de compuestos fenólicos en aguas es un indicador de contaminación por fuentes y actividad antropogénica [5].

La mayoría de los fenoles naturales son fácilmente biodegradables, así que raramente se acumulan en plantas y animales; de hecho, se pueden descomponer a CO_2 en presencia de poblaciones bacterianas. En contraste, los fenoles sintéticos son difíciles de degradar – muchos son tóxicos para los microorganismos – y son persistentes en el ambiente [2].

El fenol es tóxico para los seres vivos. La inhalación de sus vapores puede causar daños en las vías respiratorias y pulmones y el contacto con el líquido puede causar daño severo a piel y ojos. También, la exposición prolongada puede causar parálisis en el sistema nervioso central y la muerte. Además, el fenol inhibe la permeabilidad pasiva y el crecimiento de las plantas. El fenol y sus derivados han sido considerados contaminantes por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, *EPA*, por sus siglas en inglés. Su toxicidad incrementa cuando aumenta el número de átomos de cloro o nitrógeno en la molécula. De esta manera, el pentaclorofenol y el trinitrofenol (ácido pícrico) son los compuestos más tóxicos de entre todos los cloro y nitrofenoles, respectivamente [2].

Las aguas naturales contienen bajas concentraciones de fenol que pueden aumentar a través de la contaminación con aguas industriales y domésticas, además de la degradación de fungicidas, herbicidas y otros tipos de pesticidas. El fenol presente en el agua clorada favorece la formación de clorofenoles, los cuales le dan un olor y sabor extremadamente desagradables al agua – aún a bajas concentraciones - [2].

2.2 Determinación de contaminantes a concentraciones traza en agua

Los contaminantes en concentraciones de trazas siempre presentan dificultades especiales para su medición analítica debido a esas bajas concentraciones en el agua. No sólo representan problemas en la detección, sino también el análisis puede estar sujeto a interferencias con todos los demás constituyentes del agua, muchos de los cuales están en concentraciones mucho mayores que los miligramos por litro. Los reactivos químicos usados como parte del procedimiento analítico, por ejemplo, los disolventes utilizados para

la extracción de los contaminantes del agua, también tienen que estar libres de sustancias interferentes. En el análisis de trazas, el procedimiento analítico debe ser muy específico para el contaminante de interés o, de lo contrario, se necesita el uso de procedimientos que permitan la separación de la sustancia de la mayoría de los demás constituyentes de la disolución; también se pueden cumplir ambas condiciones [9].

2.3 Análisis por inyección en flujo

Desde la introducción del concepto en 1975 por J. Ružička y E.H. Hansen [10], esta técnica ha tenido un profundo impacto en la manera de implementar procedimientos analíticos. El análisis por inyección en flujo (*FIA*, *flow injection analysis*, en inglés) ha permitido ejecutar procedimientos nuevos y únicos y, en muchos casos, ni siquiera viables por métodos tradicionales en lote [11].

En los últimos años, los clásicos métodos *FIA* han sido mejorados debido al desarrollo de técnicas de análisis en flujo más avanzadas y a nuevos sistemas de detección. Estos avances en la instrumentación, al mismo tiempo, inducen al mejoramiento de las características de las metodologías desarrolladas, como: mayor capacidad de análisis por hora, límites de detección más bajos, intervalos dinámicos lineales más amplios, desviaciones estándar relativas más bajas, entre otras [5].

El *FIA* se basa en la inyección de una muestra líquida en una corriente acarreadora continua, no segmentada, de un líquido adecuado. La muestra inyectada forma una zona, la cual es transportada hacia un detector. La mezcla del reactivo en la corriente se hace principalmente por procesos controlados por difusión, efectuándose una reacción química. El detector registra continuamente la absorbancia, el potencial de electrodo u otro parámetro físico que varíe como resultado del paso del material de la muestra por la celda de flujo [12]. El análisis en flujo permite realizar mediciones rápidas, precisas y de bajo costo, al emplear pequeñas cantidades de muestra con bajo consumo de reactivos, lo cual es un objetivo importante de la química verde. Además, se minimiza el error del analista, permite realizar múltiples análisis, puede ser miniaturizado y es fácilmente automatizable [13].

Una característica clave del análisis por inyección en flujo es cómo se reproducen todas las condiciones, la dispersión está controlada y es reproducible. Es decir, todas las muestras se procesan secuencialmente de la misma manera a su paso por el canal analítico [12].

Los conceptos básicos del *FIA* son [11]:

Marco teórico

- Inyección o inserción de un volumen de disolución de muestra, bien definido, dentro de una corriente de un fluido acarreador en flujo (ya sea inerte o reactivo); los reactivos adicionales deben ser añadidos subsecuentemente;
- tiempo de manipulación reproducible y preciso de la zona de muestra inyectada cuando es introducida al sistema, desde el punto de inyección hasta el de detección; y
- la generación de un gradiente de concentración de la muestra inyectada, obteniendo una señal transiente, pero altamente reproducible de la señal registrada.

Generalmente, se suele usar una bomba peristáltica para propulsar los líquidos [12]. Las longitudes de los tubos y la velocidad de rotación de la bomba peristáltica son los que fijan el tiempo de reacción. Si se requieren tiempos largos por problemas cinéticos, se intercala un tubo de gran longitud, generalmente embobinado en forma de bucle, para aumentar el tiempo de residencia [4]. En los análisis de proceso, estas bombas no son adecuadas porque debe cambiarse con frecuencia el tubo de la bomba y se usan bombas más robustas, como las de jeringa o bien el bombeo se hace por desplazamiento de aire en un recipiente. El inyector puede ser una válvula inyectora giratoria, como las que se usan en *HPLC*. Una derivación permite el paso del fluido acarreador cuando la válvula de inyección está en la posición de carga. El volumen de la muestra inyectada puede ser de 1 a 200 μL que, a su vez, no requiere más de 0.5 mL del reactivo por ciclo de muestreo. Esto hace que el análisis por inyección en flujo sea una técnica microquímica sencilla, capaz de tener una gran rapidez de muestreo y de consumir mínimas cantidades de muestra y reactivo [12]. El régimen es laminar, lo que reduce el peligro de la mezcla de una muestra con otra [4]. La bomba, la válvula y el detector pueden estar controlados por computadora en operación automatizada [12]. Una configuración de un *FIA* simple se muestra en la Figura 1a [14].

La señal obtenida, evaluada con un dispositivo de detección adecuado, siempre es el resultado de dos procesos cinéticos simultáneos; concretamente el proceso físico de dispersión de zona y el proceso químico superpuesto que resulta en una reacción entre el analito y las especies reactivas [11]. Debido a la dispersión, la respuesta de detector es la de un pico asimétrico que sigue una distribución del tipo χ^2 (Figura 1b). La altura y área de los picos son proporcionales a las concentraciones de la especie detectada, lo que permite obtener las curvas de calibrado necesarias para las determinaciones [4].

De forma contraria a lo que se busca con otras técnicas, en el *FIA* sólo se pretende que el porcentaje de la reacción sea siempre constante y reproducible (no se requiere alcanzar el equilibrio químico). Esto se consigue gracias a la buena reproducibilidad del comportamiento hidrodinámico del sistema [4].

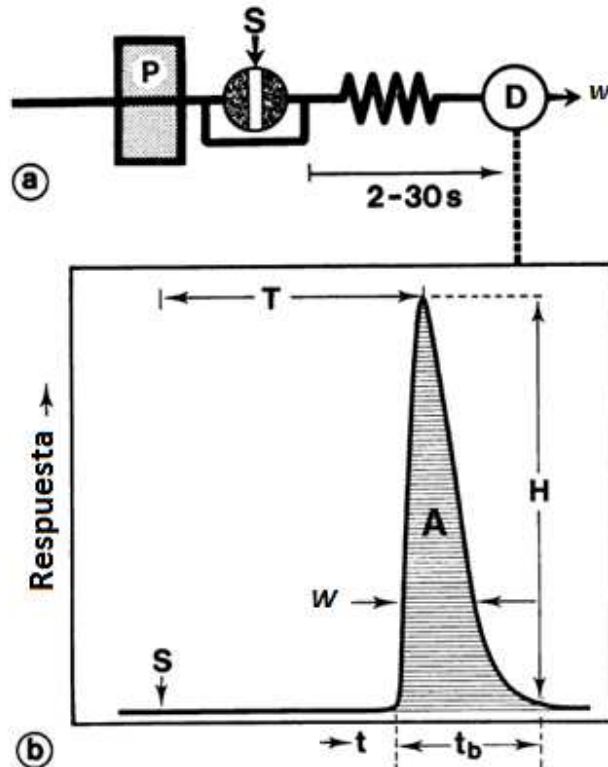


Figura 1. (a) Configuración *FIA* más simple utilizando como fluido acarreador una corriente de reactivo; *S* es el puerto de inyección, *D* es la celda de flujo, y *w* son los desechos. (b) La salida análoga tiene la forma de un pico, el inicio de almacenamiento a *S* (tiempo de inyección t_b). *H* es la altura de pico, *W* es el ancho de pico a un nivel seleccionado, y *A* es el área de pico, *T* es el tiempo de residencia correspondiente a la medición de altura de pico y t_b es el ancho de pico a la línea base [14]

2.4 Determinación de fenoles en agua

Existen una gran cantidad de métodos analíticos para la determinación analítica de fenoles. El método estándar para la determinación de fenol está basado en la reacción de Emerson [15], que consiste en su oxidación en medio alcalino con $K_3[Fe(CN)_6]$ y su subsecuente condensación con 4-aminoantipirina (4-AAP) para formar una imina colorida que se detecta espectrofotométricamente. Esta reacción se presenta en la Figura 2. Este método funciona bien para fenoles *orto*- y *meta*-sustituidos, pero no permite detectar fenoles *p*-sustituidos debido a que no reaccionan con 4-AAP [8]. Si el pH se ajusta adecuadamente se pueden

Marco teórico

determinar ciertos fenoles *para-* sustituidos con sustituyentes ácidos metoxilos, halogenados, carboxilados y sulfónicos. Con esta reacción no es posible determinar fenoles *p*-sustituidos donde el sustituyente es un grupo alquil, aril, nitro, benzoil, nitroso o aldehído [16].

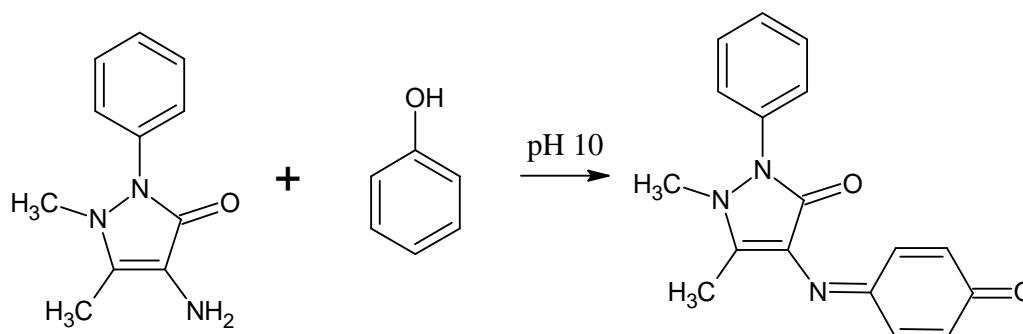


Figura 2. Reacción entre el 4-AAP y el fenol. La molécula resultante presenta un color amarillo o ámbar en el complejo con presencia de ion ferrocianato [15]

El uso de índices totales es un punto intermedio entre los métodos cualitativos y los métodos completamente cuantitativos y es conveniente porque permite obtener información química cuantitativa relacionada con una característica concreta de la muestra, pero no con un compuesto específico. Los índices totales aportan información química útil sobre familias de compuestos amplias y heterogéneas de forma rápida cuando el análisis individual no es viable. Uno de los índices totales más comunes es en la determinación de fenoles. Si no es necesaria la identificación de los compuestos fenólicos se utiliza la reacción de Emerson y el resultado se reporta como fenoles totales [5]. Éste es el método normado por la *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* [16] y es el método recomendado por la NMX-AA-050-SCFI-2001 [17].

De acuerdo con los métodos normalizados, las muestras deben ser previamente destiladas en un medio ácido para remover las impurezas no volátiles como aminas aromáticas e incrementar la selectividad [2].

La espectrofotometría en medio acuoso está recomendada para muestras que contengan concentraciones de fenol por encima de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este método fue adaptado por Möller y Martin [18] y ha sido empleado por varios autores con ferrocianuro de potasio o persulfato de potasio como oxidante [2].

Para el análisis individual de fenoles se emplean procedimientos cromatográficos, donde no únicamente se requieren pre-tratamientos de muestra como destilación y/o filtración,

sino que además los límites de detección sin preconcentración usualmente son muy altos [8].

Las extracciones líquido-líquido se utilizan para preconcentrar fenoles; sin embargo, se recomienda realizar previamente una derivatización de los analitos a fin de mejorar la eficiencia de recuperación y mejorar el desempeño cromatográfico [8].

Möller y Martin [18] fueron los primeros en proponer una metodología de análisis por inyección en flujo para la determinación de fenol, basándose en la reacción de Emerson. Para ello propusieron la configuración que se muestra en la Figura 3. Como fluido acarreador se empleó agua destilada, y además dos disoluciones reactivas: R1 que consistió en 4-AAP 0.1230 M en disolución amortiguadora de NaHCO_3 0.2738 M, H_3BO_3 0.4367 M y KOH 0.6238 M; R2 fue una disolución oxidante de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.1849 M. Se inyectaron 200 μL de las muestras dentro de la corriente del fluido acarreador y posteriormente se mezclaba con la solución de 4-AAP/amortiguador (R1) y la del oxidante (R2). La absorbancia se midió a 515 nm.

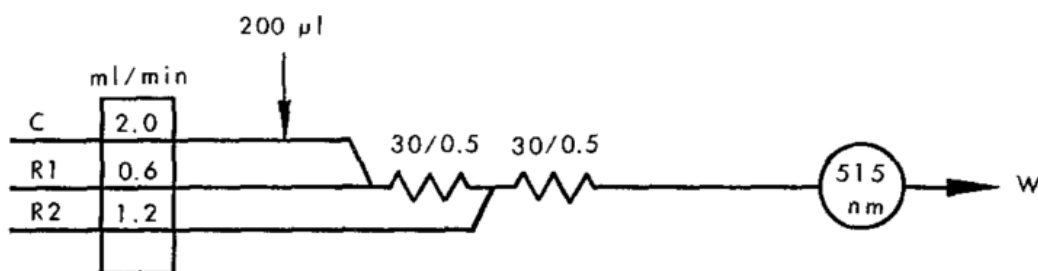


Figura 3. Configuración empleada para la determinación de fenol. C: fluido acarreador; R1: 4-AAP/amortiguador, R2: oxidante, bucles de mezclado de 30 cm/0.5 mm d.i., W, desechos [18]

Además, se hizo una modificación que permitiera la preconcentración del fenol, a fin de mejorar la sensibilidad del método. Las muestras se inyectaron en la corriente del fluido acarreador y posteriormente se mezclaron con los reactivos. La fase acuosa fue segmentada con cloroformo y la extracción del producto colorido de la fase orgánica tuvo lugar en un bucle de extracción fijo. La separación de fases se realizó en un separador de membrana y la fase orgánica fue dirigida a una celda de flujo del espectrofotómetro (467 nm).

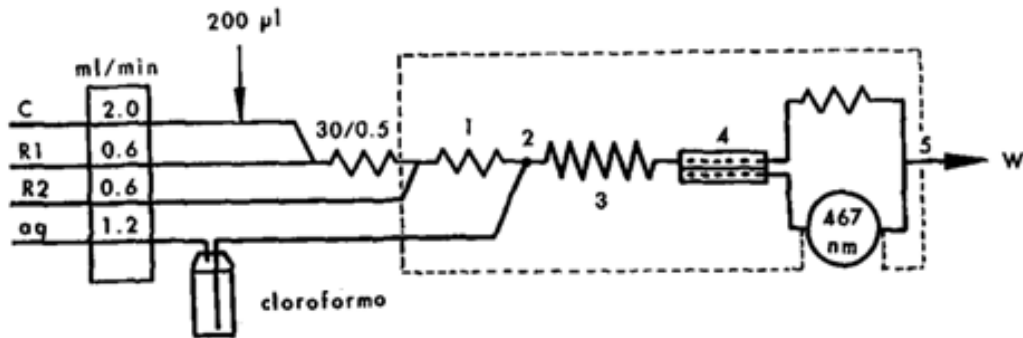


Figura 4. Configuración *FIA*-extracción para la determinación de fenol. *C*: fluido acarreador; *R1*: 4-AAP/amortiguador, *R2*: oxidante; *aq* corriente acuosa para la botella de desplazamiento que contiene cloroformo; línea de ruptura del módulo de extracción; 1 bucle de mezclado en la fase acuosa; 2 segmentador; 3 bucle de extracción; 4 membrana de separación; 5 junta de salida de desechos [18]

Satienperakul y colaboradores [8] diseñaron un método por *FIA* para la determinación de fenoles en agua residual, ungüento antiséptico y preservador de madera. Este método implicó la derivatización del fenol a acetato de fenilo por pervaporación y la detección fue amperométrica. El diseño de la configuración se muestra en la Figura 5.

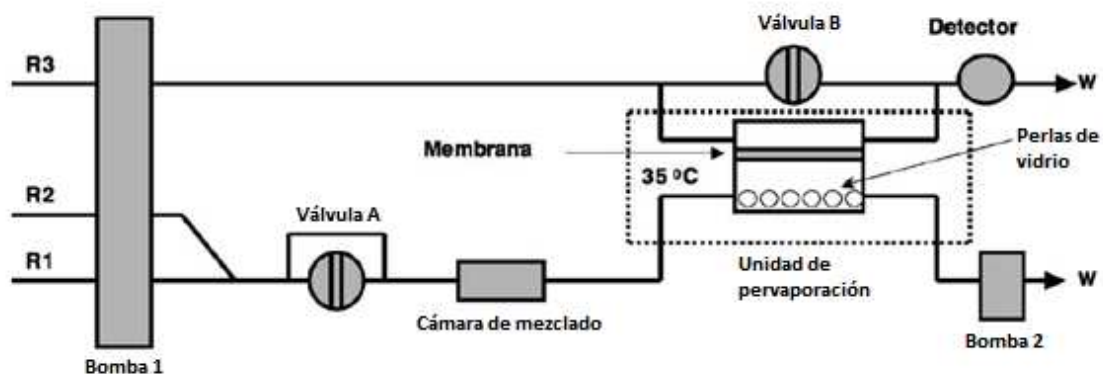


Figura 5. Configuración experimental para la derivatización en línea por PIFr en el análisis de fenol: *R1*, disolución de fenol; *R2*, disolución NaOH/NaCl; *R3*, disolución electrolítica NaOH/KNO₃; válvula A, 20 μ L de bucle de muestra; Detector, amperométrico con electrodo de trabajo de carbón vitrificado; +0.62 V (vs. Ag/AgCl) [8]

La cámara del donador contenía una capa sencilla de perlas de vidrio (3.0 mm de diámetro) para ayudar a mantener constante el nivel de líquido y asegurar una buena reproducibilidad. La temperatura de la unidad de pervaporación fue ajustada a 35°C por inmersión en un baño de agua con termostato. La mezcla eficiente del anhídrido acético con el fenol se realizó en una cámara de mezclado que contenía una barra de agitación magnética. Otros dispositivos de mezclado incluían un mezclador estático helicoidal construido de

Marco teórico

mezcladores de poliacetato de 4.76 mm, montado en un tubo de silicona de 5 mm d.i. y 18 cm de largo. Se empleó una membrana semi-permeable de politetrafluoroetileno, PTFE, (40 mm de diámetro, 1.5 mm de grosor) para separar las cámaras de donador y receptor.

La derivatización del fenol en línea por pervaporación en inyección en flujo reversa (PIFr) se realizó por inyección directa de 20 μL de anhídrido acético (válvula A) dentro de la corriente del donador, dando por resultado una mezcla de disolución de fenol acidificada (R1) con una corriente alcalina de cloruro de sodio (R2). La reacción de esterificación se presenta en la Figura 6. La mezcla de reacción se pasó a través de la cámara de mezclado para producir etanoato de fenilo, el cual se transportaba a la unidad de pervaporación. Después de la evaporación dentro del espacio superior (*headspace*, en inglés) de la unidad de pervaporación, el etanoato de fenilo se difundió a través de la membrana hidrofóbica hacia la disolución alcalina estática (R3) dentro de la cámara del receptor donde fue retenida por 15 min. El etanoato de fenilo hidrolizado a ion fenolato fue transferido después de reiniciar el flujo en la corriente del receptor a un detector electroquímico donde fue oxidado en un electrodo de carbono vitrificado a +0.62 V (contra Ag/AgCl).

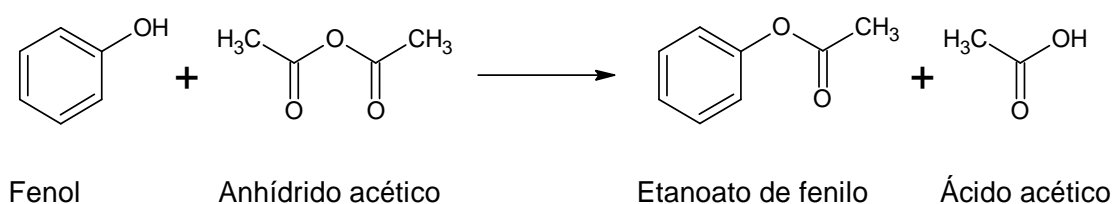


Figura 6. Reacción de esterificación entre el fenol y el anhídrido acético [19]

Cao y colaboradores [20] desarrollaron un método de determinación de fenol aprovechando que el KMnO_4 puede oxidarlo en medio ácido y producir una débil quimioluminiscencia con un límite de detección de sólo $3 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$.

La corriente de reactivo KMnO_4 ($8.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) y disolución de HCl (2.0 mol L^{-1}) se usaron como oxidantes y la disolución de formaldehído como reactivo de mejora de la señal. Se inyectaron 100 μL de disolución estándar de fenol y formaldehído (8%, v/v) dentro de una corriente de disolución KMnO_4 y HCl, y la altura de pico de quimioluminiscencia fue medida para su cuantificación. El esquema de la configuración empleada se muestra en la Figura 7. Las características del método se resumen en el Cuadro 2.

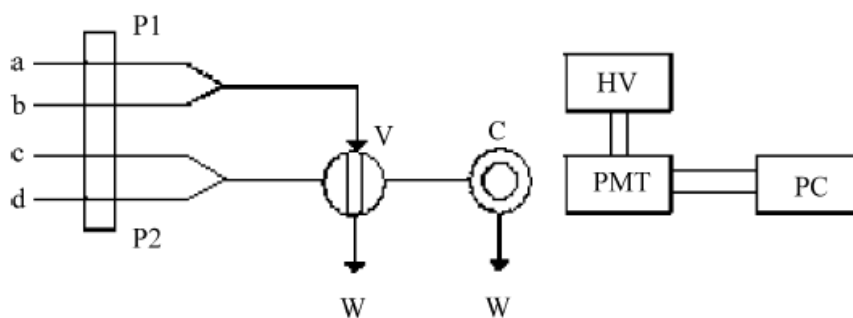


Figura 7. Diagrama esquemático de un analizador por inyección en flujo con quimioluminiscencia. (a) Disolución de fenol, (b) disolución de formaldehído, (c) disolución de KMnO_4 , (d) disolución de HCl , (P) bomba peristáltica, (V) válvula de inyección de muestra, (C) celda de flujo, (W) desechos, (HV) alto voltaje, (PTM) tubo fotomultiplicador, (PC) computadora personal [20]

Por otro lado, Dolatto y colaboradores [21] desarrollaron un método analítico para la determinación de fenol y *o*-cresol en extractos de suelo por *FIA* con un método espectrofotométrico basado en la reacción de Emerson. La configuración empleada se presenta en la Figura 8, mientras que las características del método se resumen en el Cuadro 2.

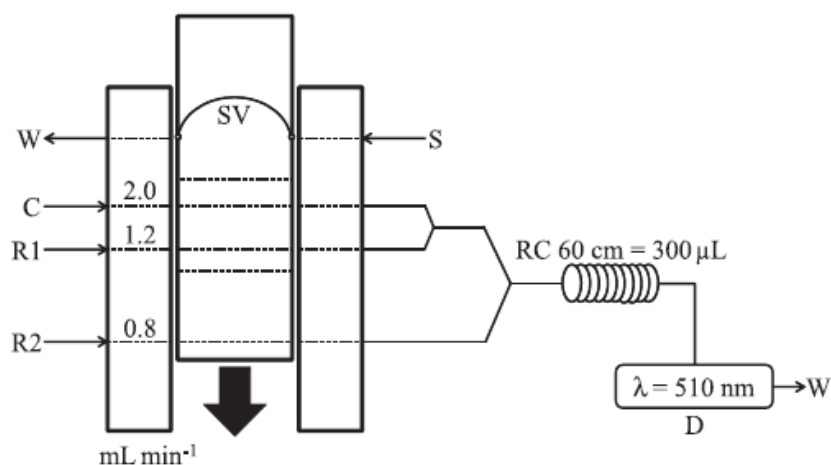


Figura 8. Sistema FIA optimizado para la cuantificación de fenol y *o*-cresol. C: agua desionizada como fluido acarreador, R_1 : disolución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2.0 g L^{-1} a pH 11.0; R_2 : disolución de 4-AAP 1.00 g L^{-1} a pH 10.0 ± 0.2 amortiguado con disolución de H_3B_3 , KOH y NaHCO_3 ; S: muestra; SV: volumen de muestra ($400 \mu\text{L}$), inyectado con la ayuda de un inyector-conmutador; RC: espiral de reacción (60 cm de longitud, volumen de $300 \mu\text{L}$); D: detección espectrofotométrica a 510 nm. El diámetro interno de la tubería Tygon® en la bomba peristáltica, RC y en el camino analítico fue de 0.8 mm; W: desechos [21]

Las muestras de suelo fueron tratadas previo a su inyección en el sistema *FIA*. Para esto, se tomaron $10 \pm 0.0001 \text{ g}$ de muestra de suelo y se mantuvieron en agitación suave con

Marco teórico

300 mL de CaCl_2 0.01 M en un matraz ámbar con tapa por 96 horas. La suspensión se centrifugó a 2500 rpm por 10 min y se tomaron 25 mL del sobrenadante, los cuales se fortificaron con fenol para tener concentraciones de 1.00, 10.00 y 50.00 mg/L; se realizó el mismo procedimiento para *o*-cresol. Estas disoluciones se mantuvieron en agitación por 15 min para después hacer la cuantificación de los analitos por *FIA*.

Posteriormente, se inyectaron las muestras y estándares en el sistema *FIA*. Se introdujeron 400 μL de muestra en el fluido acarreador, para luego confluir con la disolución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y entonces mezclarse con la disolución de 4-AAP amortiguada a pH 10, para poder llevar a cabo la reacción de Emerson.

Finalmente, de forma preliminar el grupo de trabajo de que salió esta investigación ha reportado [3] una optimización para la determinación de fenoles totales por *FIA* basado en la reacción de Emerson. Los factores a optimizar fueron la longitud de dos reactores, los caudales así como las concentraciones de las disoluciones de amoníaco, 4-AAP y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y el volumen de inyección. Para ello se empleó como primer diseño experimental un Plackett-Burman $2^{7 \times 3/32}$ y, posteriormente, un factorial fraccionado 2^{5-2} con tres puntos centrales. Se concluyó que las condiciones óptimas para esta determinación eran reactores de 80 y 180 cm de longitud, NH_3 0.064 M a un caudal de 1.0 mL/min como fluido acarreador, 4-AAP 9.84×10^{-3} M a 0.35 mL/min, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.02 M a 0.35 mL/min con un volumen de inyección de 200 μL .

En el Cuadro 2 se presentan los diversos métodos analíticos que se han descrito en la literatura que emplean análisis en flujo continuo para la determinación de compuestos fenólicos en diferentes matrices.

Cuadro 2. Comparación de diferentes métodos de análisis en flujo para la determinación de compuestos fenólicos

Técnica en flujo	Analitos	Pretratamiento/ preconcentración	Principio	Detección	Muestras	LOD (mg/L)	DER (%)	Intervalo lineal (mg/L)	Velocidad de muestreo (muestras/h)	Referencia
FIA	Fenol	Extracción con membrana con cloroformo como fase orgánica	Reacción con 4-AAP	515 nm	Aguas claras y superficiales	0.04	<1% (n=10) (intervalo alto) y <1.5% (n=10) (intervalo bajo)	1-15 y 0.05-1.0	75 sin preconcentración	[18]
SIA	Fenol	No	Reacción con 4-AAP	510 nm	Agua residual	0.01	1.2	0.05-25	24	[22]
SIA	Compuestos fenólicos	No	Reacción con 4-AAP	540 nm	Agua residual de industria maderera	0.1	2.1 (n=10)	0.5-25	12	[23]
FIA	Fenol	Pervaporación reversa	Reacción a fenilacetato y detección como fenolato	Electroquímica	Agua de río y efluente, crema antiséptica y aceite preservador de madera	0.025	2-5 (n=3)	0.05-1	4	[8]
MSFIA	Fenoles	No	Reacción con 4-AAP	500 nm	Agua de río y agua residual	0.001	0.6 (n=10)	0.01-0.1	90	[24]
FIA	Fenoles	Extracción en fase sólida con Amberlita XAD-4	Reacción con 4-AAP	490 nm	Agua y agua residual	0.004	2.4	0.01-1	12	[25]
FIA	Fenoles	Extracción en fase sólida con gel de sílice modificado con C ₁₈	Luminol-K ₃ Fe(CN) ₆	QL	Agua de río y agua residual.	6.6 x 10 ⁻⁷	1.5 (n=7)	4.7 x 10 ⁻⁶ - 4.707 x 10 ⁻⁴	----	[26]
FIA	Fenol	Extracción en fase sólida con Amberlita XAD-4	Oxidación con KMnO ₄ en medio ácido	QL	Agua residual y subterránea	0.005	11.6 (n=15)	0.001-0.02	4	[2]
FIA	Fenol	No	Oxidación con KMnO ₄ en medio ácido y formaldehído	QL	Agua residual	0.003	1.2 (n=11)	0.005 - 1	-----	[20]
FIA	Fenol y o-cresol	No	Reacción con 4-AAP	510 nm	Extractos de suelo	Fenol: 0.25; o-	-----	0.5-16.0	-----	[21]

Cuadro 2. Comparación de diferentes métodos de análisis en flujo para la determinación de compuestos fenólicos (continuación)

Marco teórico

Técnica en flujo	Analitos	Pretratamiento/preconcentración	Principio	Detección	Muestras	LOD (mg/L)	DER (%)	Intervalo lineal (mg/L)	Velocidad de muestreo (muestras/h)	Referencia
						cresol: 0.08				
FIA	Fenoles	Fase sólida Amberlita XAD-4	Reacción con 4-AAP	510 nm	Percolado de suelos	2×10^{-4}	2.7 ($n=11$)	5×10^{-4} -0.06	8	[27]
MSFIA	11 compuestos fenólicos	Amberlita XAD-4, Lichrolut EN y Macronet MN-200	Separación con columna monolítica Chromolith RP-18e	HPLC-DAD	Agua mineral, de grifo y de mar.	18 ng	<4.7 ($n>6$)	0.02-0.2, excepto para Lichrolut EN: 0.006-0.03	-----	[28]
MSFIA	Compuestos fenólicos	Amberlita XAD-4	Reacción con 4-AAP	510 nm	Muestras certificadas	0.009 ^E , 0.002 ^F	3.5, 2.4	0.027-6.4, 0.02-0.28	10-16, 4	[29]
FIA	Fenoles totales	No	Reacción con 4-AAP	510 nm	Agua potable y embotellada	0.13	1.37 a 1.0 mg/ y 0.82 a 15 mg/L	0.3 – 30	36	[3]

^E Volumen de muestra variable, 0.500-6.00 mL.

^F Volumen de muestra fijo, 24.0 mL.

2.5 Determinación de fenoles por extracción en fase sólida acoplada a FIA

La extracción en fase sólida (*SPE*, *solid phase extraction*, en inglés) consiste en la puesta en contacto de una muestra líquida, gaseosa o extractos líquidos procedentes de muestras sólidas, con una fase sólida sobre la que el analito es adsorbido selectivamente. En otras palabras, la *SPE* se produce debido a diferente afinidad que presentan los analitos contenidos en una muestra por una fase sólida o por el disolvente que contiene la muestra [30]. De esta manera, al hacer pasar la muestra a través de una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etcétera), algunos compuestos quedarán retenido sobre su superficie ella mientras que otros pasarán inalterados. Posteriormente, si los analitos de interés han quedado retenidos, éstos podrán ser eluidos con un pequeño volumen de disolvente [31].

La *SPE* generalmente se aplica como un paso previo al análisis de la muestra, ya que con ella se pueden lograr diferentes objetivos [30]:

1. Preconcentración de trazas: se logra al pasar por la fase sólida un volumen elevado de muestra que contiene al analito. Posteriormente, el analito es eluido con un volumen mucho menor de disolvente para, de esta manera, obtener factores de preconcentración elevados.
2. Limpieza de muestras (*clean-up*, en inglés): se realiza a fin de que la muestra esté libre de interferencias. En algunas ocasiones se emplean adsorbentes que retienen selectivamente al analito y en otros se usan adsorbentes que retengan las interferencias.
3. Estabilización de muestras: se emplea cuando los analitos no son estables o tienen cierta volatilidad en medio líquido. En otras ocasiones, la *SPE* facilita el transporte de las muestras del lugar de muestreo al laboratorio.
4. Cambio de fase: útil, por ejemplo, cuando la muestra se encuentra en fase acuosa y se requiere analizar por cromatografía de gases, CG, en fase orgánica.
5. Fraccionamiento de muestras complejas: Al cambiar la polaridad del disolvente de elución, se pueden obtener diferentes fracciones de la muestra.

Actualmente, existen dos modos de trabajo en *SPE* [30]:

- Estático: se mezclan el adsorbente y la muestra líquida en un tubo y se separan ambas fases por centrifugación o filtración.

Marco teórico

- Dinámico: la muestra se pasa a través del adsorbente previamente empaquetado en una columna. La fase sólida puede empaquetarse manualmente, o se pueden adquirir cartuchos previamente empacados.

En *SPE*, existen dos factores que son muy importantes, estos son [31]:

- Capacidad del adsorbente: es la máxima cantidad de analito (y de compuestos interferentes) que puede ser retenida en una determinada cantidad de adsorbente. Es decir, una vez que todos los sitios activos del adsorbente están ocupados, el resto de los compuestos pasa a través del sólido sin quedar retenidos.
- Volumen de fuga: es el volumen máximo de muestra que puede hacerse pasar a través del adsorbente sin que se produzcan pérdidas de analito.

En general, una vez que se tiene la columna empacada con el adsorbente, la *SPE* se ejecuta en una serie de pasos comunes que se describen a continuación [30]:

1. Acondicionamiento del adsorbente: se pasa a través del adsorbente un disolvente o disolución, similar al que contiene la muestra, para que posteriormente pueda interactuar con los analitos.
2. Adsorción: se pasa un determinado volumen de muestra. De acuerdo con la polaridad del adsorbente, los analitos y el disolvente, los analitos (y/o interferentes) se quedarán retenidos en la fase sólida, mientras que el resto de los componentes de la muestra pasan sin ser retenidos.
3. Lavado: el adsorbente se lava con un disolvente adecuado para eliminar en lo posible las interferencias retenidas, mientras que los analitos deben quedar retenidos en el mismo.
4. Elución: los analitos ya purificados se eluyen con la ayuda de un disolvente adecuado. Este extracto puede ser posteriormente concentrado.

La extracción en fase sólida está gobernada por la ley de distribución de Nerst:

$$k_D = \frac{[X]_B}{[X]_A} \quad (1)$$

donde K_D es el coeficiente de distribución del analito x , y $[X]_A$ y $[X]_B$ son las concentraciones al equilibrio del analito x en la fase adsorbente A y en la fase extraída B , respectivamente. De esta ecuación se deduce que, a valores altos de K_D ocurre la adsorción de los analitos, y a K_D bajos tiene lugar su desorción [32].

El recobro en muestras fortificadas se calcula midiendo la cantidad de analito eluido del adsorbente y comparando la concentración inicial con el remanente después de la *SPE*. Aunque la retención y la elución son dos etapas separadas en el proceso de *SPE*, el valor medido es el recobro total, el cual depende tanto de la eficiencia de la adsorción como de la elución. Por lo tanto, el recobro es dependiente de ambas etapas:

$$\text{recobro} = \text{eficiencia de la adsorción} \times \text{eficiencia de la desorción} \quad (2)$$

Si la eficiencia de la adsorción es del 50% pero la de la desorción es del 100% el recobro medido será de 50% pero no se podrá saber cuál de los procesos es ineficiente o si el bajo recobro se debe a ambos. Alternativamente, se puede usar un diseño factorial para optimizar rápidamente las variables importantes que afectan la *SPE*. De esta manera, es importante considerar que los factores que más influyen la retención (una vez que se ha elegido el adsorbente adecuado) son el pH y el volumen de muestra, la masa de adsorbente, el disolvente de elución y el volumen empleado [32]. Cuando pueden ser controlados también es importante el estudio del caudal de carga de la muestra y el caudal de elución, como se ha demostrado en diferentes estudios [2,25,29].

Para los procedimientos de *SPE* existen dos modalidades: fuera de línea (*off-line* en inglés), cuando la preparación de la muestra se lleva a cabo completamente separada del resto del análisis (por ejemplo, cromatografía o alguna determinación en flujo continuo) y en línea (*on-line* en inglés), cuando hay una conexión directa al sistema de análisis [33]. La ventaja que representa el proceso *on-line* comparado con el proceso *off-line* es que en el primero hay una miniaturización, lo que implica menor volumen de muestra, adsorbente y disolventes empleados (y, por tanto, menor costo) y también implica una simplificación en el proceso, ya que se eliminan las etapas de concentración del disolvente eluido y de reconstitución del extracto (muy comunes cuando se realiza una extracción con cartuchos) y otras se acortan, como el secado y lavado del cartucho debido a la reducción en las dimensiones [34].

Un factor importante cuando se desarrolla una metodología de *SPE* es la elección del adsorbente. Entre los adsorbentes empleados con más frecuencia para las técnicas *on-line* se encuentran sílices enlazadas, copolímeros hidrofóbicos de estireno-divinilbenceno (*ST-DVB*) y polidimetilsiloxano (*PDMS*, por sus siglas en inglés), *Tenax*, carbón activado para la retención selectiva de compuestos de elevada polaridad y, en menor medida, cambiadores iónicos, materiales de tipo mixto como intercambiadores catiónicos y aniónicos mezclados con C18 para el enriquecimiento simultáneo de compuestos polares

y apolares, y materiales selectivos, como los polímeros de impresión molecular (*MIP*, por sus siglas en inglés) y la extracción en fase inmunosorbentes (*ISPE*, por sus siglas en inglés) [34].

El uso de columnas empacadas con copolímeros de *ST-DVB* como adsorbentes para la remoción de compuestos orgánicos en matrices acuosas ha sido ampliamente reportado, tanto para aplicaciones analíticas como a gran escala. La alta hidrofobicidad de estos adsorbentes los hace particularmente adecuados para la extracción de solutos hidrofílicos del agua [35]. La propiedades de adsorción de las resinas de *ST-PDV* pueden atribuirse a su estructura polimérica aromática que puede interactuar con analitos aromáticos vía interacciones $\pi - \pi$. Un ejemplo de este tipo de polímeros se muestra en la Figura 9. Sin embargo, debido a su alta hidrofobicidad son menos selectivos. Además, estos adsorbentes presentan una baja retención de analitos polares. No obstante, modificando el pH de la disolución se puede cambiar el tipo de analitos retenidos, a fin de hacer una separación más selectiva [32]. Para el caso de la preconcentración de fenoles en línea, las fase sólidas más reportadas son la Amberlita XAD-4 y el *Lichrolut EN* [2,25,27–29,36].

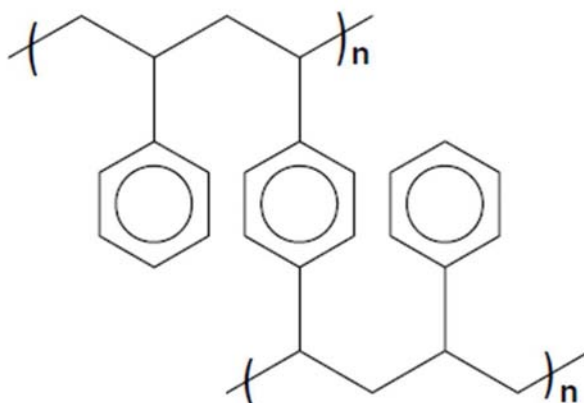


Figura 9. Estructura química de un copolímero entrecruzado de estireno-divinilbenceno

Los copolímeros tipo Amberlita XAD han sido los adsorbentes más usados para enriquecimiento de trazas en muestras ambientales. Son resinas no iónicas macrorreticulares cuya matriz es de *ST-DVB* [37] con capacidad para preconcentrar desde analitos no polares a relativamente polares [33]. Tienen como características su estructura macroporosa, buena rigidez, buenas propiedades hidráulicas y su bajo costo [35].

Por otra parte, el *Lichrolut EN* es un adsorbente basado en *ST-DVB* con alto grado de entrecruzamiento [28] que se caracteriza por su alta área superficial específica, su

estructura porosa estable, su estabilidad adsorbente en un amplio intervalo de pH y su efectividad como material en *SPE* [38]. En el Cuadro 3 se muestran algunas de las características físicas de Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*.

Cuadro 3. Características de Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN* [38]

Característica	Amberlita XAD-4	<i>Lichrolut EN</i>
Área superficial BET ⁷ (m ² /g)	949	1512
Volumen de poro (cm ³ /g)	1.341	0.827

En el Cuadro 3 se observa que *Lichrolut EN* posee una mayor área superficial, lo que permite que una mayor cantidad de moléculas sean adsorbidas en la superficie, mientras que el mayor tamaño de poro lo presenta Amberlita XAD-4, lo que permite que sean retenidas moléculas de mayor tamaño.

Ku y Lee [7] estudiaron la adsorción de diversos compuestos fenólicos en Amberlita XAD-4 a diferentes valores de pH, considerando las propiedades ácido-base de los fenoles, modelos de adsorción y el coeficiente de partición octanol-agua, K_{ow} . Concluyeron que la adsorción de los fenoles aumenta a pH ácido y disminuye a pH alcalino; asimismo, aumenta con la temperatura y la constante de adsorción se relaciona con K_{ow} ; además, calcularon los coeficientes, que se muestran en el Cuadro 4. K_D corresponde al coeficiente de partición entre la Amberlita XAD-4 y la fase acuosa, mientras que K_{ad1} y K_{ad2} corresponden a los coeficientes de adsorción a pH <4 y pH >10, respectivamente.

Cuadro 4. Coeficientes de adsorción de fenoles en Amberlita XAD-4 [7]

	K_D	K_{ad1} (L/mmol)	K_{ad2} (L/mmol)
Fenol	0.5	0.0930	0.0030
2-clorofenol	1.34	0.37	0.018

Como se observa, los valores de K_{ad1} son mayores que K_{ad2} , por lo que se concluye que a pH ácido los fenoles se adsorben en la Amberlita XAD-4, mientras que a pH alcalino los compuestos ya no son retenidos, y pueden ser eluidos. Además, de acuerdo con estos valores, el compuesto que puede ser más fácilmente retenido es el 2-clorofenol y puede ser eluido con más facilidad, lo que en principio querría decir que es el compuesto que más se puede preconcentrar con esta resina.

⁷ Determinada por el método de Braunauer-Emmet-Teller (BET)

Marco teórico

Cronológicamente, el primero de estos adsorbentes en ser estudiado para la extracción de compuestos fenólicos por *SPE* en línea fue la Amberlita XAD-4. Zhi y colaboradores [27] desarrollaron un método para determinar fenoles en lixiviados de suelo con un método de flujo continuo y detección espectrofotométrica, con una preconcentración con Amberlita XAD-4. Se usaron condiciones muy parecidas a las propuestas por Möller y Martin [18] para la determinación por *FIA*, la diferencia consistió en que los estándares de fenol se prepararon en HCl 0.1 M, para permitir la adsorción del analito, lo cual es consistente con lo reportado para el adsorbente [7]. La elución se llevó a cabo con NaOH 0.1 M. El sistema empleado para este análisis se presenta en la Figura 10. Las características del método se mostraron en el Cuadro 2.

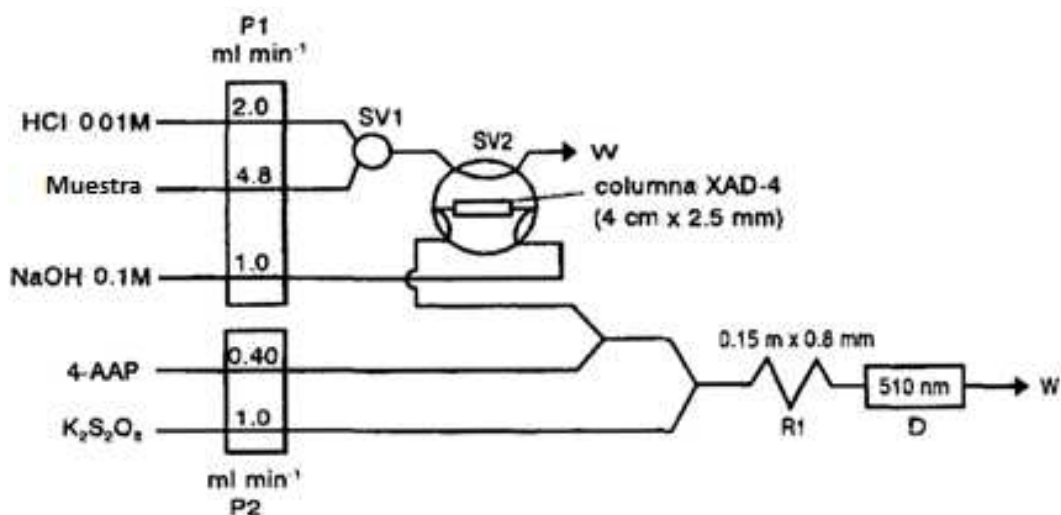


Figura 10. Configuración *FIA* para la determinación de fenoles en fase acuosa. *D*, espectrofotómetro; *P1* y *P2*, bombas peristálticas; *R1*, reactor; *SV*, válvula de selección [27]

Posteriormente, Song y colaboradores [25] propusieron otro método mediante el análisis por inyección en flujo basados también en la reacción de Emerson y usando Amberlita XAD-4 como resina de preconcentración. Las características del método se resumen en el Cuadro 2 y el sistema empleado se presenta en la Figura 11.

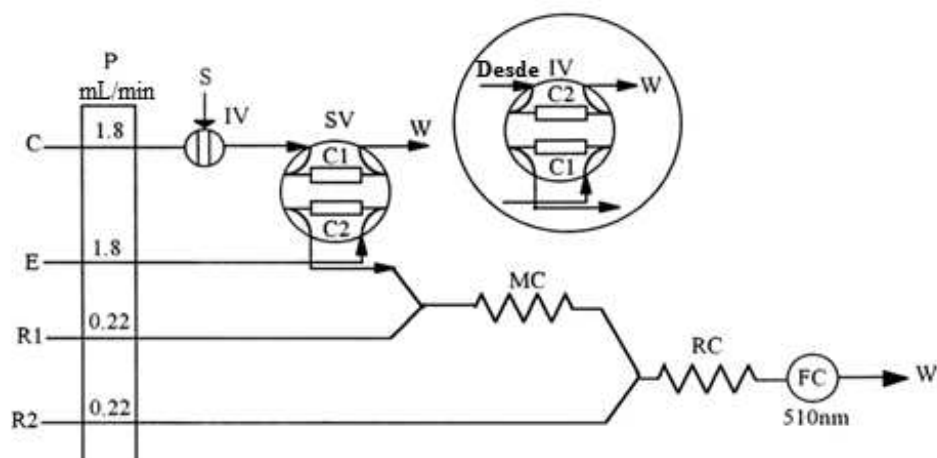


Figura 11. Sistema para la determinación de fenoles con extracción en fase sólida en línea y análisis por inyección en flujo. S, muestra; C, fluido acarreador (disolución de HCl a pH 2.0); P, bomba peristáltica de cuatro canales; W, desechos; IV, válvula de inyección; SV, válvula de selección ajustada a dos columnas cargadas con Amberlita XAD-4; FC, espectrofotómetro con celda de flujo; MC, bucle de mezclado de 30 cm de longitud; RC, reactor de 60 cm de longitud; E, eluyente (pH 13.0); R₁, disolución de 4-AAP 0.1% en disolución amortiguadora a pH 8.5; R₂, disolución K₃[Fe(CN)₆] 0.2% (pH 11.0)[25]

A fin de desarrollar un método automatizado, Oliveira y colaboradores [29] propusieron el uso de un sistema de inyección en flujo multijeringas (*MSFIA* por sus siglas en inglés) para la preconcentración y determinación de fenoles totales. También se utilizó Amberlita XAD-4 como fase sólida. En la Figura 12 se muestra la configuración empleada.

Corominas y colaboradores [2] propusieron un método para la determinación de fenoles por preconcentración directa y detección con quimioluminiscencia por *FIA*. La configuración *FIA* propuesta se muestra en la Figura 13. Para la preconcentración se usó una columna de Amberlita XAD-4. El reactor fue activado por elución sucesiva de metanol, agua, HCl 0.01 mol L⁻¹, agua, NaOH 0.01 mol L⁻¹ y agua, a una velocidad de flujo de 3 mL min⁻¹ por 5 min cada uno. El desarrollo del método involucró la preconcentración-separación del analito y su subsecuente oxidación quimioluminiscente. La emisión de quimioluminiscencia se mejoró con ayuda de ácido fórmico como sensibilizador. Las características del método se resumen en el Cuadro 2 mostrado anteriormente. Se verificó la sensibilidad del método contra 9 compuestos orgánicos interferentes y 15 interferentes inorgánicos. Debido a su alta selectividad, el método se aplicó satisfactoriamente a muestras de agua residual y subterránea.

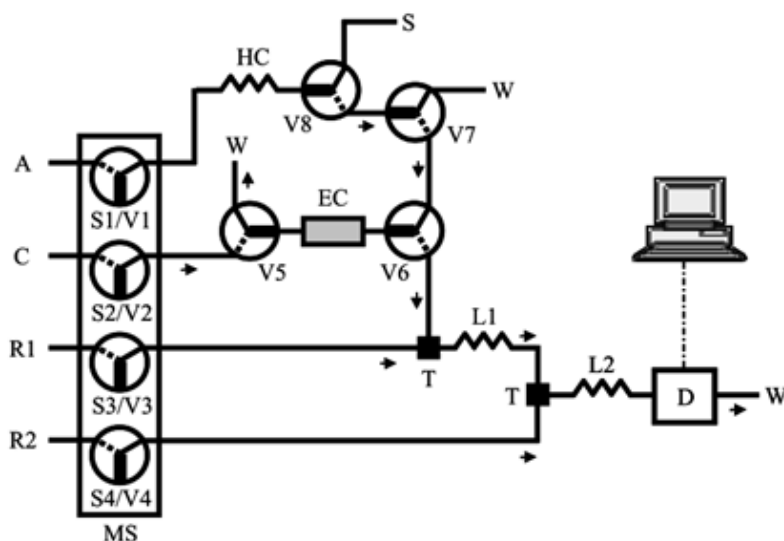


Figura 12. Configuración MSFIA para la determinación de fenoles totales con concentración en línea. *MS*, multijeringa, *Si*, jeringa; *Vi*, válvula conmutada; *D*, detector; *T*, confluencia; *Li*, conexiones de PTFE; *EC*, columna de extracción; *HC*, bucle de espera; *C*, NaOH 0.10 M; *R1*, 4-AAP 0.50 g/L; *A*, HCl 0.01 M; *S*, muestra; *W*, desechos. En las válvulas, la posición de “encendido” está representada con líneas sólidas, mientras que la posición de “apagado” está señalada como líneas punteadas [29]

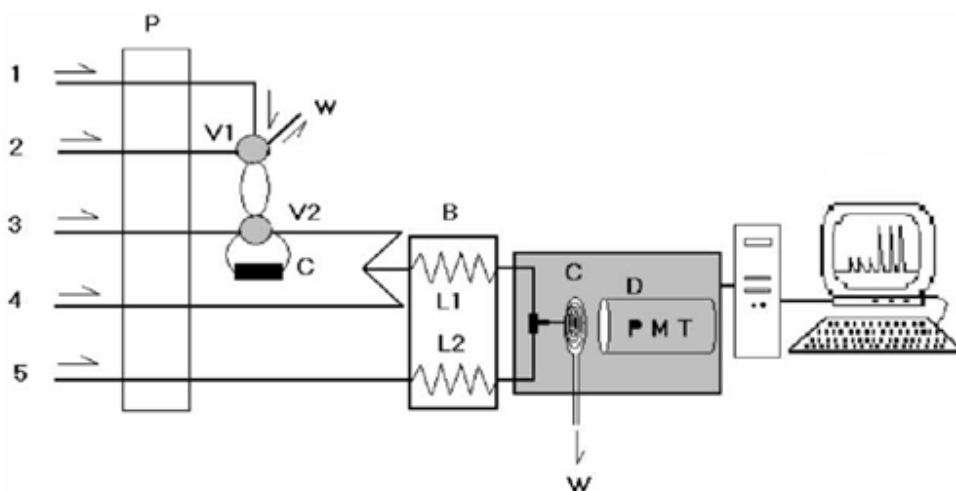


Figura 13. Propuesta de configuración en flujo para la determinación de fenol. Canal 1, disolución acuosa de fenol (3.0 mL min^{-1}); canal 2, HCL 0.01 mol L^{-1} (0.8 mL min^{-1}); canal 3, eluyente de NaOH 0.20 mol L^{-1} (1.8 mL min^{-1}); canal 4, HCOOH 0.75 mol L^{-1} y H_2SO_4 2.20 mol L^{-1} (5.4 mL min^{-1}); y canal 5, KMnO_4 $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y H_2SO_4 2.50 mol L^{-1} (5.4 mL min^{-1}). B, baño termostático a $80.0 \text{ }^\circ\text{C}$; L1 y L2 (1.0 m de longitud); C, celda de flujo; y D, detector (PMT, tubo fotomultiplicador) [2]

Finalmente, Oliveira y colaboradores [28] hicieron una comparación entre Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN* para la preconcentración de fenoles y su determinación por cromatografía de líquidos y detección por espectrofotometría UV. Para la separación se empleó una columna

Marco teórico

monolítica *Chromolith RP-18e* (100 x 4.6 mm d.i.) acoplada a una pre-columna (5x4.6 mm d.i.) del mismo material. La separación de 11 contaminantes fenólicos prioritarios se llevó a cabo en 3 min. La detección se hizo con ayuda de un detector de arreglo de diodos en el intervalo de 190-360 nm.

En la Figura 14 se presenta la configuración del sistema de preconcentración automática y de análisis por cromatografía de líquidos. La columna, empacada con los diferentes adsorbentes estudiados se sometía a un ciclo de limpieza. Primero se pasaba metanol seguido por un acondicionamiento con HCl 10 mM. Posteriormente, se hacía pasar la muestra a una velocidad de 4 mL/min, y luego se pasaba HCl a fin de remover residuos de la columna. Finalmente, se pasaba un volumen de metanol para eluir a los analitos. Las características del método también se resumen en el Cuadro 2 presentado anteriormente.

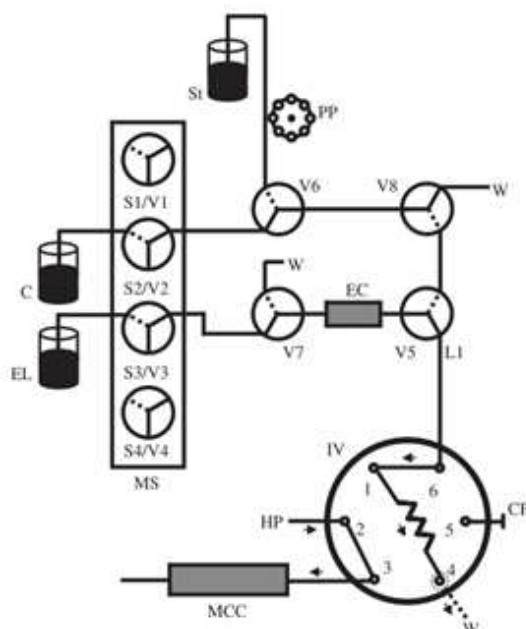


Figura 14. Configuración *MSFIA-SPE* para la preconcentración automática de compuestos fenólicos, conectado a un sistema cromatográfico a través de una válvula de inyección, representada en posición de carga. *MS*, multijeringa; *St*, jeringa; *Vi*, válvula conmutada; *EC*, columna de SPE; *IV*, válvula de inyección; *PP*, bomba peristáltica; *W*, desechos; *L1*, tubo conector (300 x 0.8 mm d.i.); *S2*, jeringa de 10 mL; *S3*, jeringa 5 mL; *C₂*, acarreador (HCl 10 mM); *EL*, eluyente (metanol); *St*, muestra o disolución estándar; *HP*, bomba de alta presión; *MC*, columna cromatográfica monolítica, *CP*, puerto cerrado. En las válvulas conmutadas, la posición de “encendido” está representadas con líneas sólidas, mientras que la posición de “apagado” está señalada como líneas punteadas. El puerto de aguja y la conexión a los residuos en *IV* también están representados por líneas punteadas [28]

Marco teórico

En resumen, existen diferentes métodos de cuantificación de fenoles por técnicas en flujo continuo que, además de posibilitar la cuantificación de los compuestos fenólicos como un índice total, permiten determinarlos aplicando detecciones más selectivas, como la quimioluminiscencia o identificarlos con ayuda de cromatografía de líquidos cuando es necesario su análisis individual.

Por último, la preconcentración de fenoles ha ido evolucionando, iniciando con extracciones líquido-líquido, pasando por la pervaporación y separaciones con membrana hasta llegar a la extracción en fase sólida. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de nuevos materiales adsorbentes, que han permitido obtener preconcentraciones cada vez mayores, lo que posibilita el análisis de fenoles a concentraciones traza.

3. Objetivos

General

- Implementar un método analítico para la determinación de fenol como fenoles totales acoplado la preconcentración en fase sólida en línea con una configuración de análisis por inyección en flujo (*FIA*).

Específicos

- Maximizar las condiciones de pH y concentración de la disolución amoniacal amortiguadora para la determinación de fenol como fenoles totales por *FIA*.
 - Establecer el intervalo de trabajo para la curva de calibración de los compuestos fenólicos.
 - Establecer la precisión del método para la determinación de compuestos fenólicos por *FIA*.
- Establecer la configuración de preconcentración para fenoles.
 - Determinar la longitud de la columna de preconcentración.
 - Determinar la composición adecuada del eluyente.
- Estudiar las variables que afectan la preconcentración de fenol por extracción en fase sólida en línea con Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*: caudal de carga, el volumen de carga, el caudal de elución y el volumen de elución a través de diseños experimentales.
- Maximizar las variables estudiadas.

4. Metodología

4.1 Reactivos y disoluciones

Fenol >99%, CAS [108-95-2]; 2-clorofenol \geq 99%, CAS [95-57-8]; 2,4,6-triclorofenol 98%, CAS [88-06-2]; 4-AAP grado reactivo, CAS [83-07-8]; $K_3[Fe(CN)_6]$ 99%, CAS [13746-66-2]; metanol \geq 99.8%, CAS [67-56-1] y HCl grado reactivo, CAS [7647-01-0] fueron obtenidos de Sigma Aldrich, mientras que NH_4Cl 99.98%, CAS [12125-02-09], NaOH 98.0%, CAS [1310-73-2]; NH_4OH grado reactivo, CAS [1336-21-6] provinieron de J.T. Baker. Amberlita XAD-4, CAS [9003-69-4] (tamaño promedio de poro: 100 Å) se adquirió de Fluka y *Lichrolut EN*, CAS [165039-45-2] de Merck. Para todas las disoluciones se empleó agua destilada.

Para las determinaciones se partía de una disolución madre de fenol (o 2-clorofenol) 1000 mg/L, la cual se hacía pesando 0.1 ± 0.0010 g de fenol y aforando a 100 mL con agua destilada; ésta se preparaba cada mes y se almacenaba en refrigeración. Los estándares de calibración se elaboraban utilizando una disolución intermedia de fenol 100 mg/L ya que la concentración de estos era muy pequeña; ésta se preparaba diariamente. Los estándares de fenol y de preconcentración se hacían por dilución de la disolución intermedia; estas se preparaban diariamente. Todas las disoluciones estándar se preparaban con agua destilada recién hervida y enfriada. Los estándares para la preconcentración fueron disueltos en HCl 0.01 M. El acondicionamiento de la columna de Amberlita XAD-4 se hizo con HCl 0.01 M y NaOH 0.1 M, mientras que para la columna de *Lichrolut EN* se empleó NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v. Los estándares de fenoles para la determinación por *FIA* fueron disueltos en el mismo medio de elución correspondiente a cada adsorbente. Para la configuración *FIA* se utilizaba disolución amortiguadora amoniacal (pH 9) 0.3 M como portador, disolución de ferrocianuro de potasio 0.02 M y disolución de 4-aminoantipirina (4-AAP) 9.8 mM; estos dos últimos reactivos se preparaban diariamente.

4.2 Instrumentación

Tanto la determinación de fenoles totales por *FIA* como la preconcentración se llevaron a cabo con ayuda de una bomba peristáltica Reglo ICC (Ismatec) programable con cuatro canales independientes. Para la detección se usó un espectrofotómetro UV-VIS Cary 1, equipado con una celda de flujo de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

Metodología

Para la determinación de fenoles totales se empleó una válvula de inyección de seis puertos Upchurch Scientific; la tubería empleada fue de Tygon, de 1.02 y 0.76 mm de d.i., los reactores en espiral se elaboraron con tubería de Teflón *PFA*.

Para la configuración de la preconcentración se usó una válvula solenoide Bio-Chem y una válvula de inyección de seis puertos Upchurch Scientific. La tubería empleada fue de Tygon, de 1.02 y 0.76 mm de d.i., mientras que la columna de extracción en fase sólida se construyó con tubería de *PFA* 1.57 x 3.17 x 508 mm, y se acopló al sistema con ayuda de nueces y férulas de *PEEK* de 3.17 mm.

4.2.1 Configuración para la determinación de fenoles totales por FIA

Para la determinación de fenoles totales por *FIA* se utilizó la configuración propuesta por el grupo de trabajo [3]. La configuración inicial del sistema *FIA* para la determinación de fenol por análisis por inyección en flujo se muestra en la Figura 15.

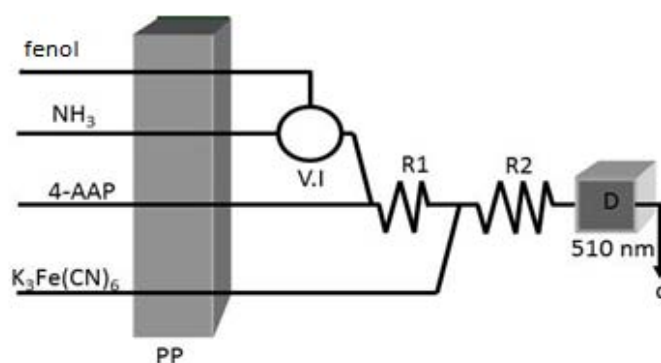


Figura 15. Configuración *FIA* para determinación de fenoles totales. PP: bomba peristáltica, D: celda de flujo con paso óptico de 1 cm ubicada dentro de un espectrofotómetro UV-VIS.

Fenol: fenol disuelto en NaOH 0.1 M, NH₃: amortiguador amoniacal pH 9.0, 4-AAP: 4-aminoantipirina 9.8 mM; K₃[Fe(CN)₆] 0.02 M. V1, válvula de inyección; R1, 80 cm; R2, 100 cm; d, desechos [3]

El volumen de inyección empleado fue de 100 μ L. Los caudales empleados fueron 0.5 mL/min para la muestra de fenol, 1.0 mL/min para el fluido acarreador, y 0.35 mL/min para los reactivos. Primero, el fenol se mezclaba con la disolución amortiguadora portadora para, posteriormente, confluir con la corriente de 4-AAP, a fin de formar la imina, producto de la condensación de 4-AAP y fenol y, finalmente, mezclarse con K₃[Fe(CN)₆]. La detección se hizo a 520 nm. Todos los estándares de fenol y 2-clorofenol fueron inyectados por triplicado y tratados por ultrasonido para la eliminación de gases disueltos previamente a su inyección.

4.2.2 Metodología para el empacado de la columna de Amberlita XAD-4

Con el fin de obtener resultados reproducibles en las preconcentraciones, se estableció un método de empacado de la columna con Amberlita XAD-4, el cual se describe a continuación:

1. A 0.1 g aproximadamente de Amberlita XAD-4 se le añadieron 5 mL de agua destilada.
2. Se introdujo la suspensión de Amberlita XAD-4, con ayuda de una bomba peristáltica, en una tubería de Teflón PFA de 1.57 x 3.17 mm. Como “fritas” se usó celulosa en cada extremo. El caudal empleado en este paso fue de 2.0 mL/min.
3. A fin de compactar la cama de Amberlita XAD-4 se hizo pasar un caudal de 1.0 mL/min de agua.
4. Una vez compactada la columna, se procedió a hacer un acondicionamiento de la columna. La secuencia se muestra a continuación (Cuadro 5):

Cuadro 5. Secuencia de acondicionamiento de Amberlita XAD-4

Disolución	Caudal (mL/min)	Tiempo (min)
Agua/Metanol 2:1	2.0	7.5
Metanol	1.5	16
Agua	2.0	7.5
HCl 0.01 M	2.0	7.5
NaOH 0.1 M	2.0	7.5
Agua	2.0	7.5

Para almacenar la columna, se mantuvo en una disolución de almacenaje consistente en Na₂CO₃ 10 g/L y NaCl 50 g/L.

4.2.3 Metodología para el empacado de la columna de Lichrolut EN

De la misma manera, se estableció un método para el empacado de esta fase adsorbente que se explica a continuación:

1. A 0.2 g aproximadamente de *Lichrolut EN* se le añadieron aproximadamente 5 mL de HCl 0.01 M.
2. Se introdujo la suspensión de *Lichrolut EN*, con ayuda de una bomba peristáltica, en una tubería de PFA de 1.57 x 3.17 mm. La longitud de la tubería se ajustaba para que la cama de adsorbente fuera de 3 cm. Como “frita” se usó celulosa en cada extremo. El caudal empleado en este paso fue de 2.0 mL/min.
3. Se compactó la cama de adsorbente haciendo pasar HCl 0.01 M a 2.00 mL/min.

Una vez compactada la columna, se procedió a hacer un acondicionamiento de la columna. La secuencia se muestra en el Cuadro 6. Para su almacenamiento se mantuvo en metanol.

Cuadro 6. Secuencia de acondicionamiento de *Lichrolut EN*

Disolución	Caudal (mL/min)	Tiempo (min)
HCl 0.01 M	2.0	5
NaOH 0.01 M en metanol 20% v/v	2.0	5
Metanol	2.0	5

4.2.4 Preconcentración de fenoles por SPE en línea

Se probó la preconcentración de fenol usando dos adsorbentes: Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*. Se implementó la configuración de la unidad de preconcentración a fin de automatizar esta etapa del análisis. La configuración utilizada se muestra en la Figura 16.

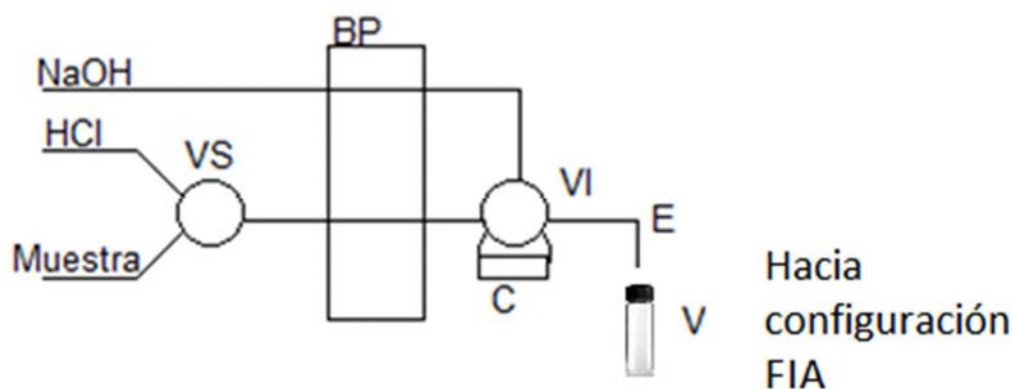


Figura 16. Configuración de unidad de preconcentración en fase sólida. NaOH: canal de eluyente, NaOH 0.1M, HCl: canal de acondicionamiento, HCl 0.01 M, Muestra: estándares de fenol y 2-clorofenol, BP: bomba peristáltica, VS: válvula solenoide, VI: válvula de inyección, C: columna de SPE, E: eluato, V: vial para recolección del eluato.

Se evaluaron diferentes condiciones de preconcentración, variando caudales y volúmenes de carga y elución y para hacer la optimización se emplearon diferentes diseños experimentales que se muestran en el capítulo de Resultados y discusiones. En el Cuadro 7 y en el Cuadro 8 se muestran las secuencias optimizadas para la preconcentración con Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*, respectivamente.

Cuadro 7. Secuencia para la preconcentración de fenoles por SPE en línea usando Lichrolut EN como adsorbente

Etapa	Posición de válvulas		Canal				Fluido alimentado a la columna
	Solenoide	Inyección	NaOH 0.1 M		HCl 0.01 M/Muestra		
			Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	
Acondicionamiento	Encendido	Carga	0.10	0.25	2.00	5.00	HCl 0.01 M
Carga de muestra	Apagado	Carga	0.10	2.00	2.50	50.00	Muestra
Lavado	Encendido	Carga	0.10	0.20	1.00	2.00	HCl 0.01 M
Elución	Encendido	Inyección	0.50	0.50	0.10	0.10	NaOH 0.1 M

Cuadro 8. Secuencia para la preconcentración de fenoles por SPE en línea usando Lichrolut EN como adsorbente

Etapa	Posición de válvulas		Canal				Fluido alimentado a la columna
	Solenoide	Inyección	Eluyente		HCl 0.01 M/Muestra		
			Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	
Acondicionamiento	Encendido	Carga	0.05	0.05	2.00	2.00	HCl 0.01 M
Carga de muestra	Apagado	Carga	0.05	1.00	5.00	100.00	Muestra
Lavado	Encendido	Carga	0.05	0.10	1.00	2.00	HCl 0.01 M
Elución	Encendido	Inyección	0.50	0.50	0.05	0.10	Eluyente

4.3 Tratamiento de datos

Para el tratamiento preliminar de los datos generados se utilizó el paquete de cómputo Excel 2013 de Microsoft y para el análisis estadístico se emplearon los paquetes Statgraphics Centurion XVI de StatPoint Technologies y Minitab 17 de Minitab Inc.

4.3.1 Diseño de experimentos para optimización de la preconcentración

A fin de estudiar las variables que afectan la preconcentración de fenoles se hicieron experimentos factoriales fraccionados 2^{k-p} , para analizar cuáles factores eran de influencia estadística significativa (con un 95% de nivel de confianza) y experimentos factoriales 2^k para optimizar la variable respuesta modificando a las variables significativas. Cada uno de estos diseños se explican a detalle en el capítulo 5. Resultados y discusiones.

4.3.2 Repetibilidad y reproducibilidad

Se hizo el estudio de la repetibilidad entre días e intra días para la determinación de fenol y 2-clorofenol por FIA. Para ello se inyectó por triplicado durante 7 días un estándar de 15

mg/L de fenol y 2-clorofenol preparados por duplicado y se determinó su concentración a partir de una curva de calibración preparada diariamente.

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad se hizo un análisis de varianza de un factor para cada analito con base en las concentraciones determinadas.

La variación entre días o repetibilidad (S_r^2) se determinó tomando en cuenta que S_r^2 es igual a la media de los cuadrados dentro de días, lo cual se representa en la siguiente ecuación:

$$S_r = \sqrt{CM_{dentro\ de\ días}} \quad (3)$$

Para calcular la reproducibilidad dentro del laboratorio (S_{WR}^2), se determinó de acuerdo a las siguientes ecuaciones donde n_j es el número de réplicas por día.

$$S_{entre\ días}^2 = (CM_{entre\ días} - CM_{dentro\ de\ días})/n_j \quad (4)$$

$$S_{WR}^2 = S_r^2 + S_{entre\ días}^2 \quad (5)$$

donde S_r^2 es la media de los cuadrados dentro de días [39].

4.3.3 Límites de detección y cuantificación

Finalmente, se calcularon los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de acuerdo con lo reportado en la bibliografía [40–42]. Para esto se empleó el ruido obtenido de la línea base y con esto y una serie de estándares a concentraciones muy bajas (0.025-1 mg/L) se determinaron LD y LC. Para el LD se toma la cantidad de analito inmediatamente posterior a 3 veces el ruido.

4.4 Disposición de los residuos generados en esta investigación

En el Anexo 2 se presenta la información sobre el destino de los residuos producidos en esta investigación.

5. Resultados y discusiones

5.1 Evaluación de la configuración *FIA*

5.1.1 Determinación del pH óptimo para la determinación de fenoles totales

Para estudiar el pH óptimo de la reacción usando la configuración *FIA* de la Figura 15 se probaron diferentes disoluciones amortiguadoras amoniacaes 0.16 M a pH 9, 10 y 11. También se utilizaron disoluciones de fenol y 2,4,6-triclorofenol (TCF) 318 μM (A) y 31.8 μM (B) para verificar la respuesta del sistema. Los resultados se muestran en la Figura 17.

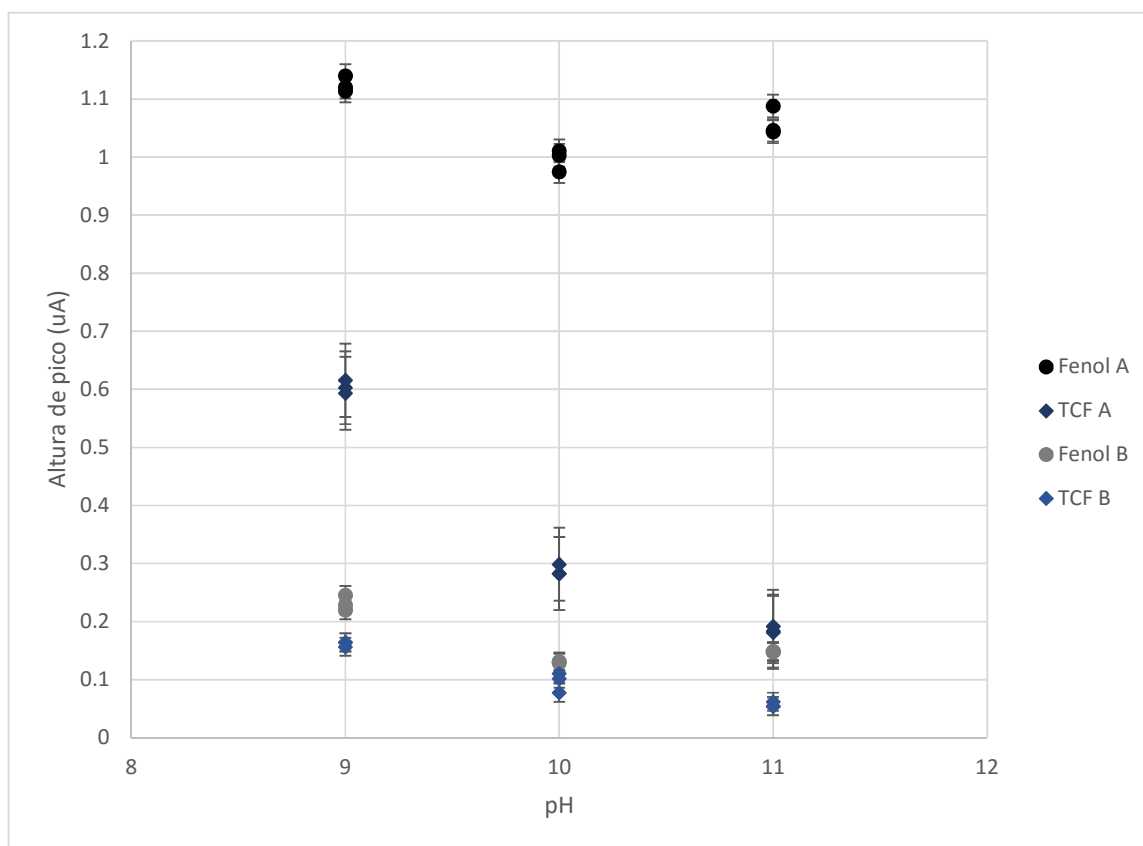


Figura 17. Altura de pico obtenida a diferentes pH para fenol y TCF a 318 (A) y 31.8 (B) μM

Se observa que las absorbancias más altas se obtienen a pH 9 para ambos analitos y esto es especialmente notorio por el TCF, por lo que se escogió este pH para la determinación de fenoles. Además, es congruente con lo encontrado por otros autores como el óptimo de esta reacción [43]. También se observa que la mayor respuesta a la misma concentración molar se obtiene para el fenol. De manera adicional, se probaron valores de pH 6, 7 y 8,

Resultados y discusiones

pero no se obtuvieron mejores respuestas, que coincide con lo encontrado por otros autores [43]. Esto se debe a que la reacción está favorecida a pH alcalino [15,43].

Debido a la escasa solubilidad del 2,4,6-triclorofenol en agua y su alta toxicidad se decidió emplear 2-clorofenol como compuesto modelo del comportamiento de los clorofenoles para los experimentos subsecuentes.

5.1.2 Influencia de la concentración de la disolución amortiguadora amoniacal de pH 9

Se realizaron tres curvas de calibración de fenol a diferentes concentraciones de la disolución amortiguadora amoniacal: 0.2, 0.3 y 0.4 M. Las rectas de las curvas de calibración se presentan en la Figura 18, mientras que los parámetros estadísticos para cada una de estas curvas se muestran en el Cuadro 9.

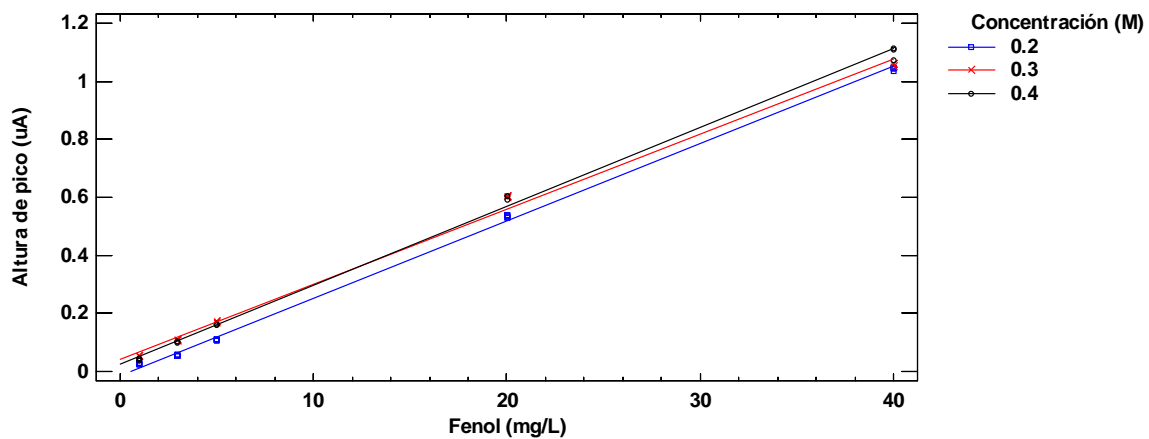


Figura 18. Curvas de calibración en la disolución amortiguadora amoniacal a pH 9 con diferentes concentraciones molares

Cuadro 9. Parámetros estadísticos obtenidos para cada curva de calibración de fenol en disolución amortiguadora amoniacal a pH 9

Concentración (M)	Intercepto (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)	R ²
0.2	-0.015	4.0×10^{-3}	0.027	2.5×10^{-4}	0.9989
0.3	0.037	8.7×10^{-3}	0.026	4.3×10^{-4}	0.9964
0.4	0.023	6.9×10^{-3}	0.027	3.4×10^{-4}	0.9979

Al hacer la comparación de las tres rectas de regresión lineal se observa que las mayores pendientes se obtienen con las disoluciones amortiguadoras de concentración 0.2 M y 0.3 M; sin embargo, a concentraciones bajas de fenol (1 y 3 mg/L) las señales más altas se dan a 0.3 M. Este comportamiento se debe a que 0.3 M es una concentración de amortiguador

Resultados y discusiones

suficiente para mantener constante el pH óptimo de la reacción y si se incrementa su concentración se aumenta la fuerza iónica y se emplea mayor cantidad de reactivos sin que se obtenga una mejor respuesta, lo cual impacta en el costo del análisis. Por lo anterior se decide emplear para futuros experimentos la disolución amortiguadora amoniaca 0.3 M a pH 9.

Una vez determinada la mejor concentración de disolución amortiguadora amoniaca se obtuvieron curvas de calibración de fenol durante diferentes días. Estas se presentan en la Figura 19 con sus respectivas rectas de regresión ponderada y sus parámetros estadísticos se presentan en el Cuadro 10. En la Figura 19 no es posible distinguir a detalle a cada una de las curvas. A fin de compararlas se hizo el análisis de varianza, el cual se muestra en el Cuadro 11. En el Anexo 1 se explica a detalle la importancia y aplicaciones del análisis de varianza así como los cálculos necesarios para su desarrollo. De acuerdo a la interpretación del cuadro de análisis de varianza, dado que el valor-P (significancia observada) para las pendientes es mayor que 0.1, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes con un nivel de confianza del 95%, pero para el caso de los interceptos, dado que el valor-P es menor que 0.01, existen diferencias significativas, existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. Esto puede explicarse debido a que cada curva de calibración abarca diferentes intervalos de trabajo. Se decidió trabajar con el intervalo de 1-40 mg/L, ya que es el más amplio.

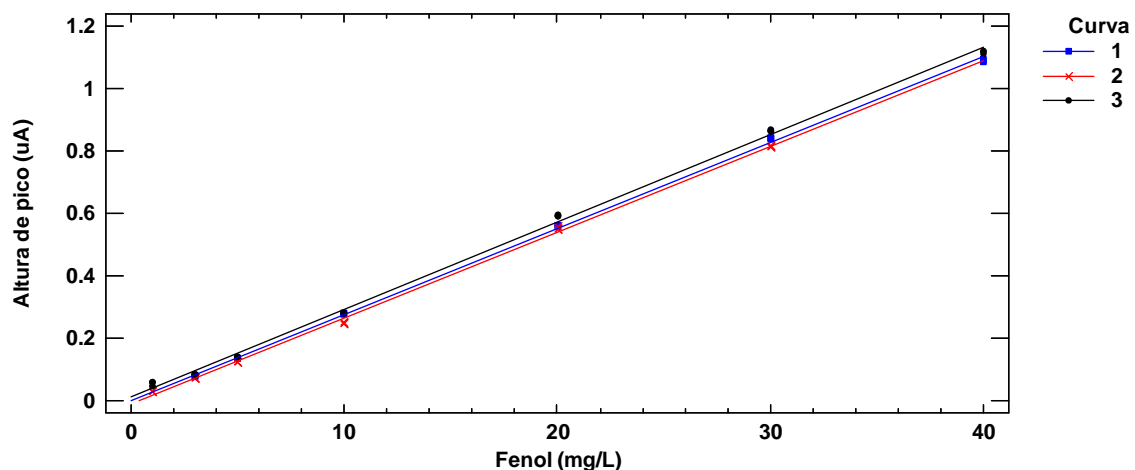


Figura 19. Comparativo de tres curvas de calibración obtenidas en diferentes días para fenol en disolución amortiguadora amoniaca 0.3 M pH 9

Resultados y discusiones

Cuadro 10. Parámetros estadísticos obtenidos para cada curva de calibración de fenol en disolución amortiguadora amoniacal pH 9 0.3 M en diferentes días

Día	Intervalo (mg/L)	Intercepto (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)	R ²
1	3-40	0.002	3.8×10^{-3}	0.027	1.7×10^{-3}	0.9994
2	1-30	-0.009	3.6×10^{-3}	0.027	2.3×10^{-4}	0.9988
3	1-40	0.011	5.1×10^{-3}	0.028	2.5×10^{-4}	0.9985

Cuadro 11. Análisis de varianza de las variables según el orden de introducción para fenol en disolución amortiguadora amoniacal a diferentes días

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Fenol	7.42709	1	7.42709	47565.70	0.0000
Interceptos	0.00798057	2	0.00399028	25.56	0.0000
Pendientes	0.000617854	2	0.000308927	1.98	0.1488
Modelo	7.43569	5			

5.2 Evaluación de la preconcentración de fenol en una columna de Amberlita XAD-4

5.2.1 Búsqueda de las mejores condiciones de preconcentración

5.2.1.1 Diseño 1: experimento factorial fraccionado 2⁴⁻¹

En esta primera etapa, a fin de determinar cuáles eran los factores que influían en la preconcentración de fenol se aplicaron diversos diseños experimentales factoriales. Los diseños experimentales fraccionados son muy útiles en las primeras etapas de experimentación, ya que cuando tenemos muchos factores a estudiar permiten reducir de manera importante el número de tratamientos experimentales, pero al mismo tiempo se sacrifica información poco importante. Debido a sus ventajas, se utilizó un diseño factorial fraccionado 2⁴⁻¹ de resolución IV para evaluar la longitud de la columna, el caudal y el volumen de carga y el caudal de elución. La matriz experimental se muestra en el Cuadro 12. Los factores y niveles evaluados se presentan en la Cuadro 13.

El efecto de un factor se define como el cambio observado en la variable de respuesta debido a un cambio de nivel de tal factor. En particular, los efectos principales son los cambios en la media de la variable respuesta que se deben a la acción individual de cada factor. En términos matemáticos, el efecto principal de un factor de dos niveles es la diferencia entre la respuesta media observada cuando tal factor estuvo en su primer nivel, y la respuesta media observada cuando el factor estuvo en su segundo nivel. Los efectos pueden graficarse en un diagrama de Pareto para así visualizar cuáles tienen un mayor impacto sobre la variable de respuesta [44].

Resultados y discusiones

Cuadro 12. Matriz experimental para el diseño factorial fraccionado 2^{4-1}

Experimento	Factor			
	A	B	C	D=+ABC
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

Cuadro 13. Factores y niveles evaluados el diseño factorial fraccionado 2^{4-1}

Factor	Descripción	-	+
A	Caudal de carga (mL/min)	0.5	1
B	Caudal de elución (mL/min)	0.5	1
C	Volumen de carga (mL)	5	10
D	Longitud de la columna (cm)	4.5	11

Se obtuvo el diagrama de Pareto, que se presenta en la Figura 20. Se puede observar que el efecto más significativo es la longitud de la columna y el volumen de carga, así como la interacción de AD+BC. La longitud de la columna tiene un efecto positivo en la preconcentración, lo cual se traduce en que al aumentarla se puede incrementar la preconcentración. Esto se debe a que al extender la longitud se añade fase sólida y, por tanto, también lo hace la cantidad de sitios activos disponibles para la retención de analitos, lo que ocasiona que una mayor cantidad sea adsorbida. Igualmente, se puede ver que el volumen de carga tiene un efecto negativo en la preconcentración, lo que quiere decir que al aumentarlo la preconcentración disminuye. Esto puede deberse a que el volumen de carga probado es superior al volumen de fuga; sin embargo, este comportamiento no se espera a volúmenes tan pequeños, por lo que se propuso probar a valores mayores, además de que éste se debe estudiar en conjunto con el caudal de carga.

Debido a la falta de réplicas no se pudieron calcular los efectos estandarizados, ya que para calcularlos se requiere la estimación del error, la cual se calcula a partir de las réplicas.

Se decide fijar el factor "longitud de la columna" a 11 cm porque, como se explicó anteriormente, si se alarga la columna se puede aumentar la preconcentración pero se generan problemas de sobrepresión en el sistema, lo que puede ocasionar fugas.

Resultados y discusiones

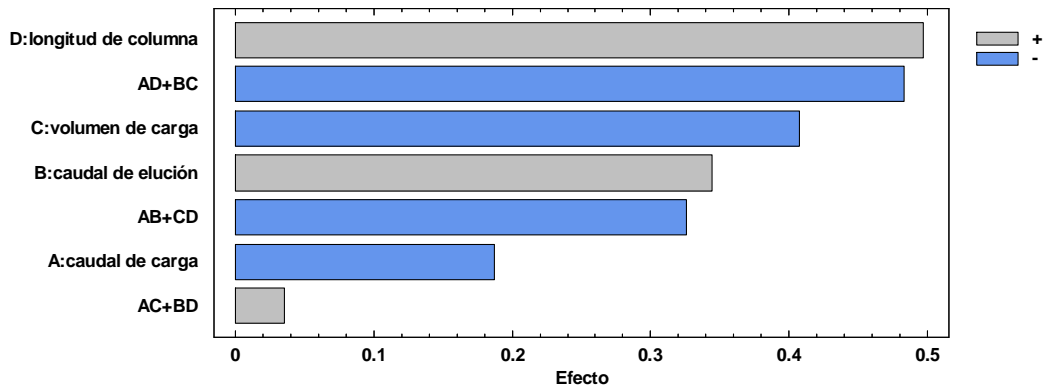


Figura 20. Diagrama de Pareto para preconcentración de fenol en experimento factorial fraccionado 2^{4-1}

5.2.1.2 Mejor volumen de elución para columna de 11 cm

Se determinó el volumen mínimo para eluir al analito de una columna de Amberlita XAD-4 de 3 x 110 mm y obtener el mayor factor de preconcentración. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 21.

Debido a la falta de normalidad de los datos, se hizo una comparación de medianas para determinar si había diferencias significativas. El gráfico obtenido se muestra en la Figura 22.

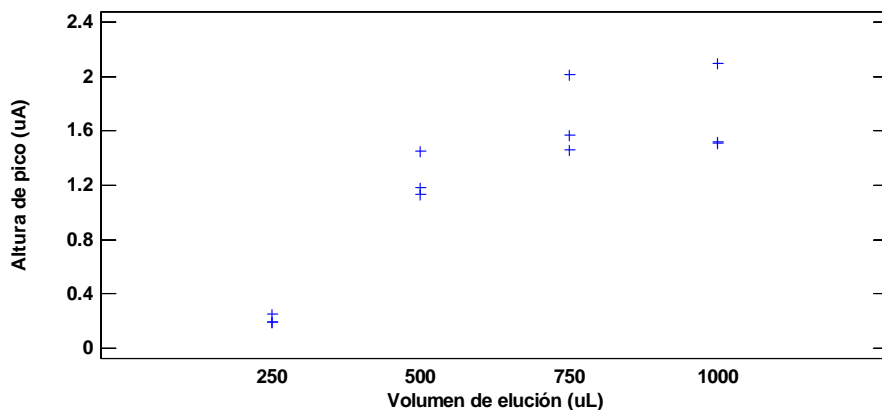


Figura 21. Dispersión por código de nivel para factores de preconcentración obtenidos a diferentes volúmenes de elución de fenol

Se observa que la altura de pico obtenida fue aumentando conforme aumentó el volumen colectado, hasta llegar a un máximo a 750 μL y después de esto la respuesta comenzó a disminuir. Esto se debió a que al aumentar el volumen de elución más allá del óptimo la concentración disminuyó con la dilución de la muestra, como consecuencia de que el analito

ya había sido eluido. Se concluye que al coleccionar un volumen de 750 μ L de una columna de 11 cm se obtiene la mayor preconcentraci3n.

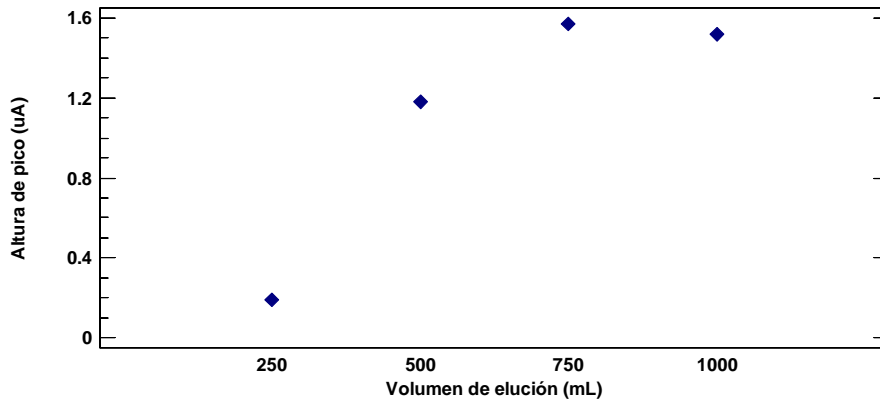


Figura 22. Gráfico de medianas para los diferentes volúmenes de eluci3n probados

5.2.2.3 Diseño 2: factorial fraccionado 2⁴⁻¹ sin réplicas

A fin de encontrar las mejores condiciones de preconcentraci3n se realizó un nuevo experimento factorial fraccionado 2⁴⁻¹ para estudiar la influencia de los diferentes factores a niveles más altos con el fin de incrementar la preconcentraci3n sin alargar considerablemente el proceso. Se aumentaron los caudales y volúmenes de carga en comparaci3n con los probados en el experimento anterior, ya que se esperaba que al aumentar el volumen de carga incrementara la cantidad de analito retenido en la columna y al aumentar el caudal de carga el tiempo de preconcentraci3n no creciera de forma considerable. En el Cuadro 14 se presenta la matriz de experimentos realizados, mientras que en el Cuadro 15 se muestran los factores probados con sus respectivos niveles.

Cuadro 14. Matriz experimental para el diseño factorial 2⁴⁻¹ con dos réplicas en el punto central

Experimento	Factor			
	A	B	C	D=+ABC
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Cuadro 15. Factores y niveles evaluados para el diseño factorial 2⁴⁻¹

Factor	Descripción	-	+
A	Caudal de carga (mL/min)	2.5	5.0
B	Volumen de carga (mL)	25.0	50.0
C	Caudal de elución (mL/min)	0.5	1.0
D	Volumen de elución (μL)	500	750

Para establecer los efectos más significativos en la preconcentración, se generó el diagrama de Pareto (Figura 23). Se observa que los efectos más significativos son el volumen de carga y el de elución, los cuales afectan de forma positiva, mientras que el caudal de elución y el de carga afectan de forma negativa. En resumen, para aumentar el valor de preconcentración se deben usar los mayores volúmenes de carga y de elución, y menores caudales de carga y de elución.

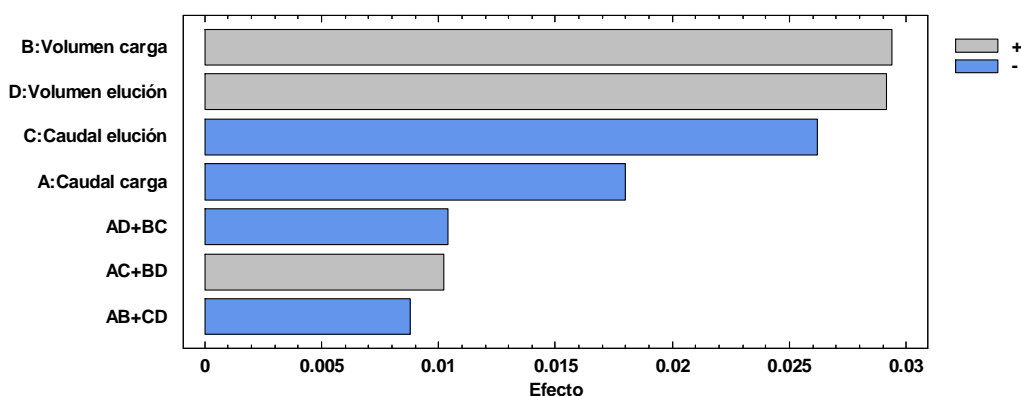


Figura 23. Diagrama de Pareto para experimento factorial 2⁴⁻¹

En cuanto al volumen de carga, tiene un efecto positivo debido a que al aumentarlo se introducen a la columna un mayor número de moléculas de analito. A pesar de esto, se eligió ya no probar volúmenes mayores ya que se prolonga el tiempo de manera importante y decrece de forma considerable el número de análisis por hora que pueden llevarse a cabo. Por otro lado, al incrementar el volumen de elución aumenta la preconcentración; esto es congruente con lo obtenido en el experimento inmediato anterior. El efecto negativo de los caudales de carga y elución se debe a que, por tratarse de equilibrios de adsorción, si el caudal es muy rápido no habrá tiempo suficiente para que las moléculas de analito interactúen con la fase sólida y no podrá llevarse a cabo la adsorción/desorción, sin embargo, si estos tiempos son muy prolongados se eleva el tiempo de preconcentración. A causa de esto se decidió usarlos a los niveles más altos para experimentos posteriores. Como son los factores con menores efectos, se esperaba que con esto se acortara el tiempo

Resultados y discusiones

de proceso sin disminuir de forma importante la preconcentración. Con base en estos resultados, en experimentos posteriores se decidió evaluar el comportamiento de los caudales de carga y elución junto con el volumen de carga, manteniendo constante el volumen de elución.

5.2.2.4 Diseño 3: experimento factorial 2^3 con columna de 11 cm

Ya que se realizó el estudio preliminar de los factores que más influyen en la preconcentración, se procedió a estudiarlos de manera más detallada. Para esto se utilizó un diseño factorial 2^3 con dos puntos centrales. Con este tipo de diseños es posible obtener grados de libertad adicionales para el error en el cuadro de análisis de varianza, sin perjudicar el balance de la estimación ni los efectos de interés y permiten detectar la posible presencia de curvatura (efectos cuadráticos) en al menos uno de los factores objeto de estudio [44]. La matriz experimental se muestra en el Cuadro 16. Los factores y niveles evaluados se presentan en el Cuadro 17.

Se obtuvo el diagrama de Pareto estandarizado con un nivel de confianza del 95% (Figura 24). En este tipo de diagrama de Pareto se representan los efectos divididos entre su error estándar; se agrega una línea a la altura del valor crítico del efecto estandarizado. De esta manera, los efectos cuyas barras superan tal línea serán significativos [44]. Se puede observar que el efecto más significativo es el caudal de elución, el cual tiene un efecto negativo. Esto se debe a que el caudal es tan grande que no puede llevarse a cabo el equilibrio entre el adsorbente y el analito. Además, se observa que para incrementar la preconcentración se debe al aumento del volumen de carga y la disminución de los caudales de carga y elución.

Cuadro 16. Matriz experimental para el diseño factorial 2^3 con dos réplicas en el centro

Experimento	Factor		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0

Cuadro 17. Factores y niveles evaluados para el diseño factorial 2^3 con dos réplicas en el centro

Factor	Descripción	-	+	0
A	Caudal de carga (mL/min)	2.5	5.0	3.75
B	Caudal de elución (mL/min)	0.5	1.0	0.75
C	Volumen de carga (mL)	25.0	50.0	37.5

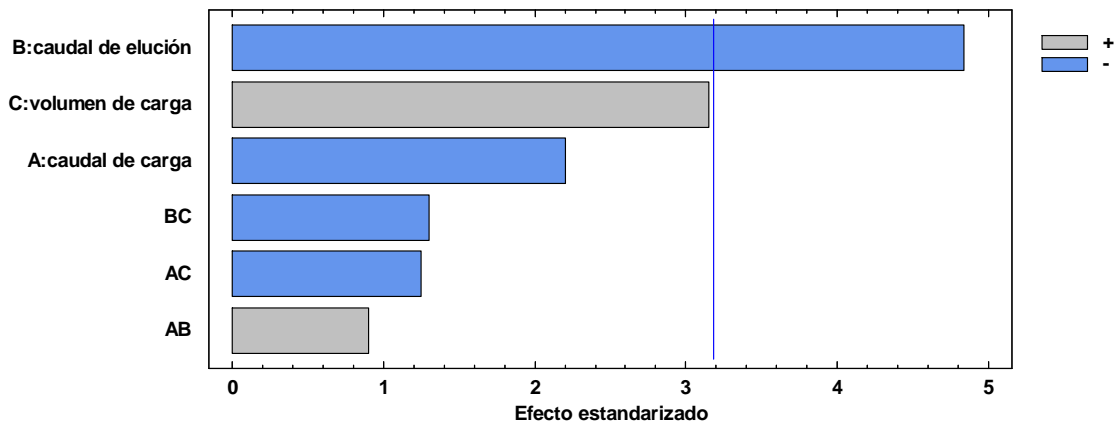


Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración de fenol. Diseño factorial 2^3

Se observa que el caudal de elución es el factor más significativo, ya que al aumentarlo se disminuye la cantidad de fenol recuperada, por lo que se debe considerar usarlo en su nivel más bajo. Esto pudo ser causado porque el alto caudal no permitía que se alcanzara el equilibrio de adsorción. Al aumentar el volumen de carga crece la respuesta. Este comportamiento podría ser causado porque al aumentar el volumen aumenta el número de moléculas que pueden ser retenidas por la fase sólida. Lo contrario sucede con el caudal de carga ya que, al aumentarlo, la respuesta disminuye; esto podría deberse a lo mismo que se expuso para el caudal de elución. El único factor estadísticamente significativo parece ser el caudal de elución, ya que es el único mayor al error aleatorio. Esto se deduce porque el efecto estandarizado es mayor que el error aleatorio y, por tanto, es estadísticamente significativo.

5.2.2.5 Volumen de fuga para la columna de 11 cm

Se hizo una curva de calibración para determinar el volumen de fuga en la columna de 11 cm de longitud. Los resultados se presentan en la Figura 25.

Se observa que en el intervalo estudiado, conforme aumenta el volumen de carga aumenta la respuesta obtenida en una relación casi lineal y, a su vez, la altura de pico obtenida está

Resultados y discusiones

relacionada con la concentración del analito después de la preconcentración. Se concluye que en el intervalo estudiado no se alcanza el volumen de fuga.

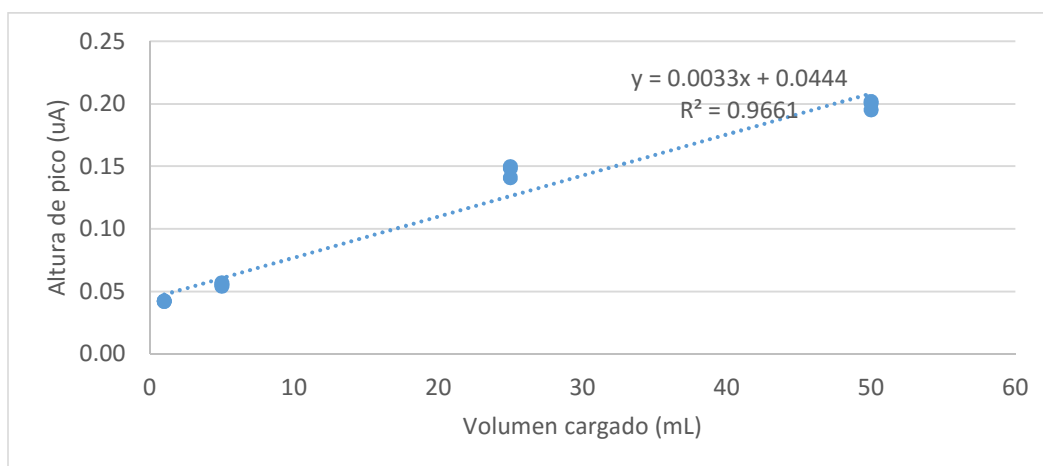


Figura 25. Volumen de fuga para fenol en columna de Amberlita XAD-4 de 3 x 110 mm

Finalmente, las mejores condiciones encontradas fueron: cargar 50 mL de la muestra en HCl 0.01 M a 2.5 mL/min y eluir con 500 μ L de NaOH 0.1 M a 0.5 mL/min. La secuencia optimizada para la preconcentración de fenoles se muestra en el Cuadro 18, utilizando la configuración de la Figura 16.

Cuadro 18. Secuencia para la preconcentración de fenol con Amberlita XAD-4

Etapa	Posición de válvulas		Canal				Fluido alimentado a la columna
	Solenoide	De inyección	NaOH 0.1 M		HCl 0.01 M/Muestra		
			Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	
Acondicionamiento	Encendido	Carga	0.10	0.25	2.00	5.00	HCl 0.01 M
Carga de muestra	Apagado	Carga	0.10	2.00	2.50	50.00	Muestra
Lavado	Encendido	Carga	0.10	0.20	1.00	2.00	HCl 0.01 M
Elución	Encendido	Inyección	0.50	0.50	0.10	0.10	NaOH 0.1 M

5.2.3 Preconcentración de compuestos fenólicos a diferentes concentraciones iniciales

Una vez determinadas las mejores condiciones para la preconcentración de fenol con Amberlita XAD-4 como adsorbente se procedió a estudiar el efecto de la concentración inicial en el factor de preconcentración obtenido para el fenol y el 2-clorofenol. Para ello se probaron concentraciones iniciales de compuestos fenólicos que fueron de 0.40 a 1.0 mg/L

Resultados y discusiones

de analito. Se calcularon los factores de preconcentración correspondientes con la siguiente ecuación:

$$F_p = \frac{\text{Concentración final de analito}}{\text{Concentración inicial de analito}} \quad (6)$$

A partir de esta ecuación se realizó la gráfica mostrada en la Figura 26.

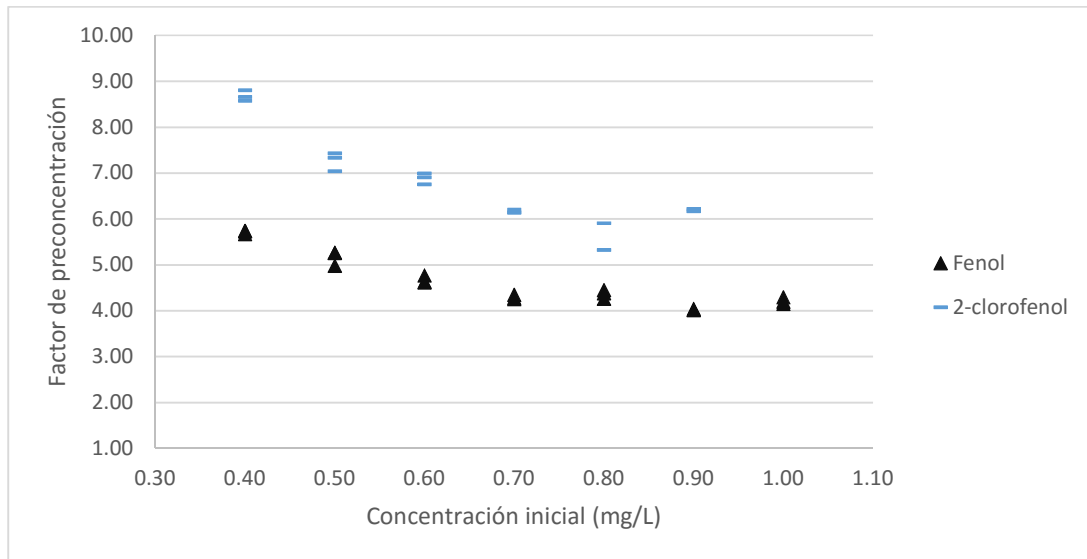


Figura 26. Factores de preconcentración obtenidos a diferentes concentraciones iniciales de compuesto fenólico

Se puede observar que el factor de preconcentración disminuye conforme aumenta la concentración inicial. Esto indica que, a bajas concentraciones de fenol en las muestras, serán mayores las preconcentraciones obtenidas. Esto pudo deberse a que a concentraciones más bajas la cantidad de sitios activos para la adsorción son mayores, por lo que los analitos se retienen más que a concentraciones altas, donde el número de moléculas es mayor y hay más competencia por los sitios activos. Si se tiene en consideración que el volumen de carga es de 50 mL y el de elución es de 500 μ L el máximo factor de preconcentración que se pudo obtener fue de 100; sin embargo, este valor no pudo ser alcanzado con las condiciones empleadas.

Además, se graficó la concentración inicial de fenol contra la concentración final obtenida, lo cual se presenta en Figura 27. En él se puede observar que la preconcentración sigue una ecuación polinomial de segundo grado, cuya ecuación del modelo se muestra en la misma figura.

Resultados y discusiones

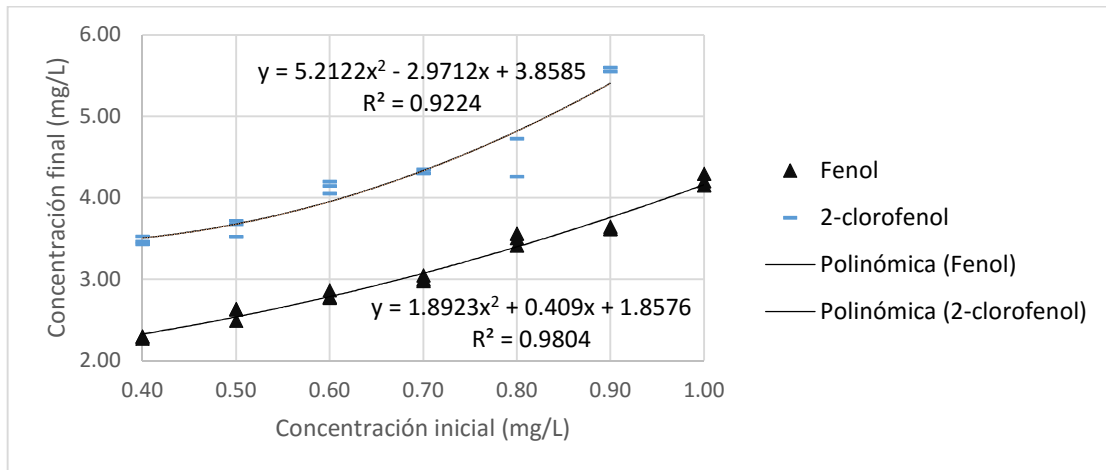


Figura 27. Modelo obtenido de la concentración inicial vs. concentración obtenida de compuesto fenólico después de la preconcentración

Se calculó la eficiencia de la extracción considerando el número de mg de analito que son introducidos a la columna de adsorbente y el número de mg de analito que son recuperados al final del proceso con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de extracción (\%)} = \frac{\text{mg de analito eluidos}}{\text{mg de analito introducidos}} \times 100\% = \frac{\text{concentración final de analito} \times \text{volumen de elución}}{\text{concentración inicial de analito} \times \text{volumen cargado}} \times 100\% \quad (7)$$

Una vez calculada la eficiencia se generó el gráfico de concentración inicial contra la eficiencia de la extracción, que se muestra en la Figura 28.

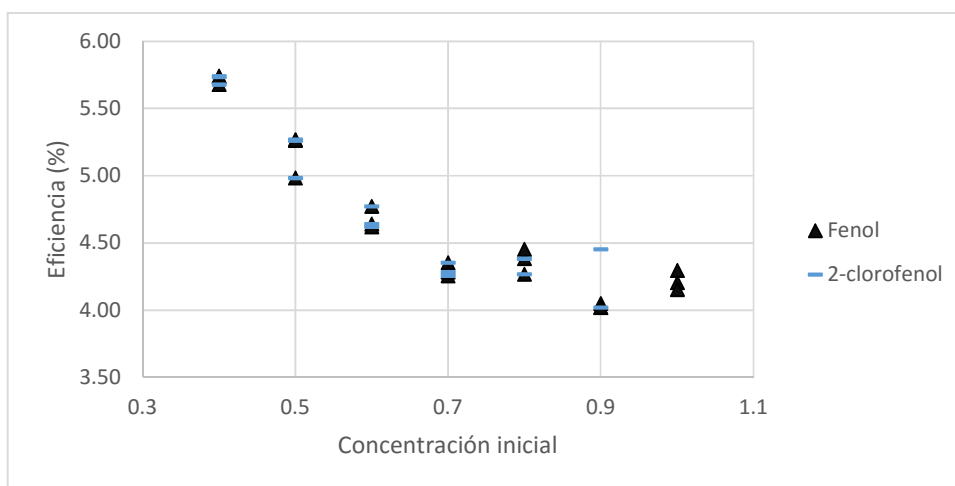


Figura 28. Concentración inicial de compuesto fenólico vs. eficiencia de la extracción

En la gráfica se observa que las eficiencias van de 5.74 a 4.15% para fenol y de 5.74 a 4.02% para 2-clorofenol. Estos valores fueron muy bajos comparados con los esperados para

Resultados y discusiones

este tipo de técnica de extracción (mayores al 80%) y para las concentraciones probadas. Considerando esto, puede concluirse que Amberlita XAD no fue eficiente como fase sólida para la extracción de fenoles.

5.3 Evaluación de la preconcentración de fenoles con *Lichrolut EN*

Debido a que en la preconcentración de fenol usando Amberlita XAD-4 no se obtuvieron resultados favorables se decidió probar otro adsorbente comúnmente referido en la literatura para la preconcentración de este tipo de analitos, *Lichrolut EN*.

5.3.1 Determinación de composición del eluyente

Durante la búsqueda bibliográfica de condiciones de elución de compuestos fenólicos en *Lichrolut EN* se encontró que la elución debe de llevarse a cabo con metanol, pero se sabe que al mezclarse con agua se generan burbujas debido a que este proceso es exotérmico, además de que disminuye la solubilidad de saturación del oxígeno y éste se libera [45,46]; por lo tanto, se probaron diferentes composiciones de la fase eluyente.

Para ello se llevó a cabo la preconcentración con una columna de *Lichrolut EN* y se probaron diferentes mezclas de eluyentes, variando las concentraciones de MeOH y manteniendo fija la concentración de NaOH a 0.1 M. Se preconcentró una disolución de trabajo de fenol con concentración inicial de 1 mg/L con el mismo programa de preconcentración que el empleado para la Amberlita XAD-4. Las alturas de pico obtenidas después de la preconcentración se muestran en la Figura 29.

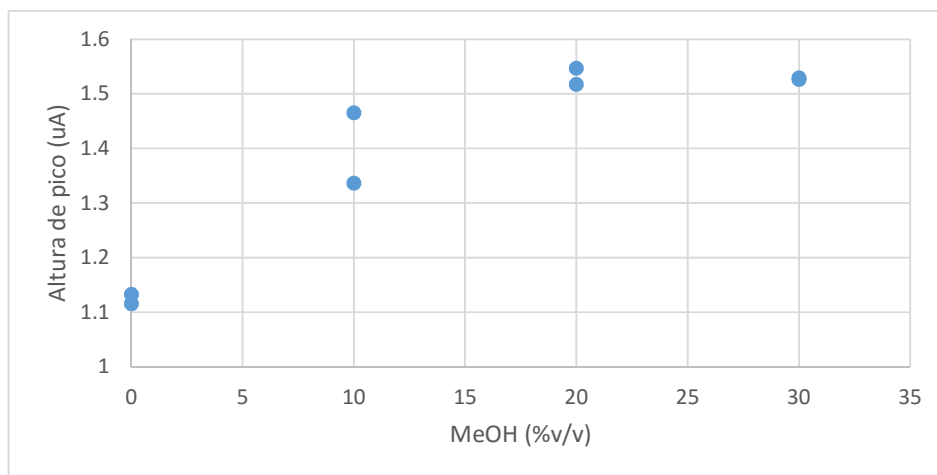


Figura 29. Gráfico de concentración de MeOH vs. altura de pico obtenida

De acuerdo con lo obtenido se concluyó que se obtiene una mayor preconcentración al eluir con la mezcla NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v. No se probaron concentraciones mayores

Resultados y discusiones

de metanol ya que la mezcla de éste con los demás reactivos acuosos del sistema *FIA* generaba problemas de burbujas, debido a la mezcla de metanol y agua en la configuración *FIA*.

5.3.2 Determinación de fenol por FIA con el eluyente modificado

Fue necesario modificar la composición de los estándares a fin de que se encontraran en la misma matriz que las preconcentraciones (diluidos en mezcla eluyente NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v). Bajo estas nuevas condiciones, se investigó el intervalo dinámico lineal, para verificar que siguiera trabajando adecuadamente.

Para verificar que las curvas no fueran significativamente diferentes de un día a otro se repitieron durante tres días en el intervalo de 1-30 mg/L, y se hizo la comparación de las rectas de regresión obtenidas. Las rectas de regresión se muestran en la Figura 30 y los parámetros estadísticos en el Cuadro 19.

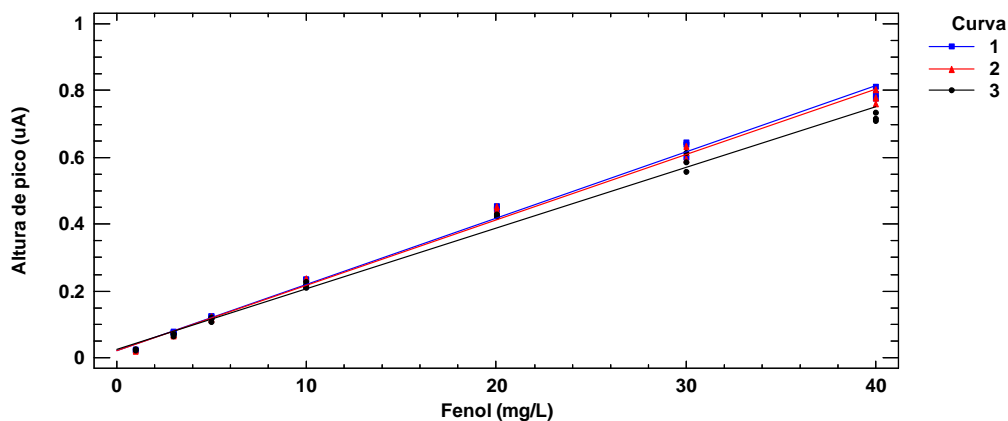


Figura 30. Comparativo de las diferentes curvas de calibración obtenidas durante diferentes días para fenol en NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v

Cuadro 19. Parámetros estadísticos obtenidos para cada curva de calibración de fenol en NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v a diferentes días en el intervalo de 0.5-30 mg/L

Día	Intercepto (uA)	s (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	s (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)	R ²
1	0.008	3.2×10^{-3}	6.45×10^{-3}	0.022	1.9×10^{-4}	3.83×10^{-4}	0.9983
2	0.008	2.5×10^{-3}	5.04×10^{-3}	0.019	1.5×10^{-4}	3.02×10^{-4}	0.9987
3	0.004	3.2×10^{-3}	6.45×10^{-3}	0.021	1.9×10^{-4}	3.83×10^{-4}	0.9982

Un análisis adecuado de los residuos proporciona información adicional sobre la calidad del ajuste del modelo de regresión y de esa manera es posible verificar si el modelo es adecuado. Las gráficas que suelen hacerse para completar el diagnóstico del modelo

Resultados y discusiones

consisten en: graficar los residuos en papel probabilidad normal, graficar los residuos contra los predichos, los residuos contra la variable regresora y contra alguna otra variable importante que no haya sido incluida en el modelo [44].

De esta manera se analizaron los residuos de las curvas de calibración, los resultados se muestran en la Figura 31. El gráfico mostrado es del tipo de residuos contra la variable regresora. Si el modelo es adecuado se espera que en esta gráfica los puntos no sigan ningún patrón y que, por tanto, estén distribuidos más o menos aleatoriamente a lo largo y ancho de la gráfica. Cuando esto ocurre significa que el modelo se ajusta de igual manera a lo largo de los valores de Y. Por el contrario, si se aprecia algún patrón habrá que ver cuál es el tipo tendencia que se observa en la gráfica y diagnosticar cuál es la falla que registra el modelo. De acuerdo con otros autores, se observa que los residuos tienen el típico comportamiento de no linealidad y heterocedasticidad [39,44]. Esto significa que una regresión lineal por mínimos cuadrados no es adecuada para los datos, y la heterocedasticidad se refiere a que la desviación estándar de los valores de Y aumenta con la concentración del analito, en vez de tener el mismo valor para todas las concentraciones. De acuerdo con este diagnóstico, se concluye que lo recomendable es aplicar regresión lineal por mínimos cuadrados ponderada [39]. El procedimiento para este tipo de regresión se explica a detalle en el Anexo 2. No se requiere aplicar la linealización de las variables, ya que al aplicar el análisis de varianza para cada recta de regresión y en los tres casos el valor-P es menor de 0.05 (95% de confianza), por lo que se puede afirmar que hay una relación lineal entre las variables.

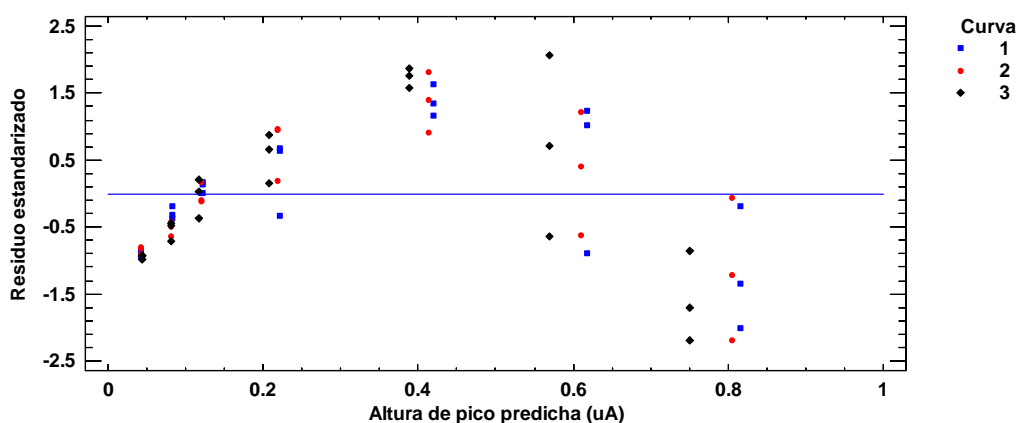


Figura 31. Gráfico de residuos para las regresiones lineales de las curvas de calibración de fenol en diluyente NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v a diferentes días en el intervalo de 0.5-30 mg/L

Resultados y discusiones

De la misma manera, se hicieron curvas de calibración durante tres días para 2-clorofenol en el intervalo acotado de 0.5-30 mg/L de analito, tal como se muestra en la Figura 32. Los parámetros estadísticos de estas curvas se muestran en el Cuadro 20.

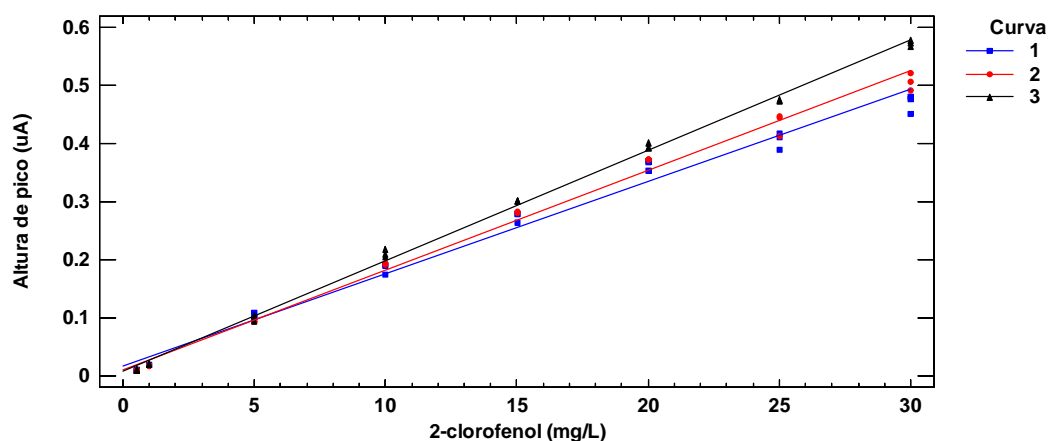


Figura 32. Comparativo de las curvas de calibración obtenidas durante diferentes días para 2-clorofenol en NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v

Cuadro 20. Parámetros estadísticos obtenidos para cada curva de calibración de fenol en NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v a diferentes días en el intervalo de 0.5-30 mg/L

Día	Intercepto (uA)	s (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	s (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)	R ²
1	0.017	6.6×10^{-3}	1.28×10^{-3}	0.016	3.9×10^{-4}	7.58×10^{-4}	0.9863
2	0.010	4.9×10^{-3}	9.52×10^{-3}	0.017	2.9×10^{-4}	5.63×10^{-4}	0.9933
3	0.008	2.9×10^{-3}	5.63×10^{-3}	0.019	1.7×10^{-4}	3.30×10^{-4}	0.9981

Asimismo se hizo un análisis de los residuos, el cual se muestra en la Figura 33. Se observó el mismo comportamiento que para fenol, por lo que también se consideró hacer una regresión ponderada de los datos. El gráfico de residuos para las curvas de calibración de 2-clorofenol se presenta en la Figura 33.

La regresión ponderada se realizó según lo reportado en la literatura [39,47] y con ayuda del software Minitab 17. En el Anexo 2 se explica a detalle este procedimiento. A continuación se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para fenol (Cuadro 21) y 2-clorofenol (Cuadro 22).

Resultados y discusiones

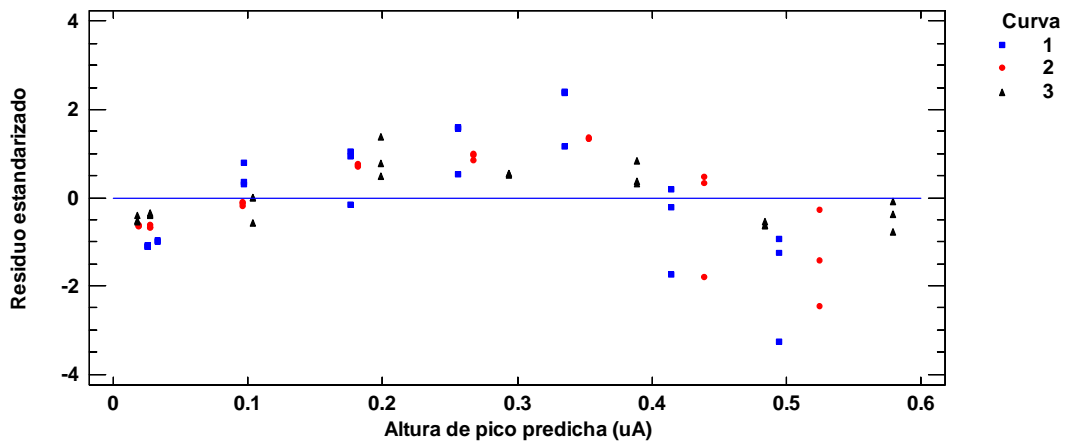


Figura 33. Gráfico de residuos para las regresiones lineales de las curvas de calibración de 2-clorofenol en diluyente a diferentes días en el intervalo de 0.5-30 mg/L

Cuadro 21. Parámetros estadísticos obtenidos para cada curva de calibración ponderada de fenol en NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v a diferentes días en el intervalo de 0.5-30 mg/L

Día	Intercepto (uA)	s (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	s (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)
1	0.007	5.8×10^{-3}	1.1×10^{-2}	0.022	2.9×10^{-4}	8.3×10^{-2}
2	0.002	1.1×10^{-3}	2.1×10^{-3}	0.020	2.6×10^{-4}	5.0×10^{-4}
3	0.000	7.6×10^{-4}	1.5×10^{-4}	0.022	1.3×10^{-4}	2.5×10^{-4}

Cuadro 22. Parámetros estadísticos obtenidos para cada curva de calibración ponderada de 2-clorofenol en NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v a diferentes días en el intervalo de 0.5-30 mg/L

Día	Intercepto (uA)	s (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	s (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)
1	0.001	6.7×10^{-4}	1.3×10^{-3}	0.018	6.4×10^{-4}	1.2×10^{-3}
2	0.002	1.8×10^{-3}	3.5×10^{-3}	0.019	1.2×10^{-4}	2.3×10^{-4}
3	0.005	4.0×10^{-3}	7.8×10^{-3}	0.019	3.1×10^{-4}	6.0×10^{-4}

En la Figura 34 se muestra a manera de ejemplo la recta ponderada del día 1 para fenol con su correspondiente intervalo de confianza para la predicción.

Al hacer la comparación de los parámetros de regresión antes y después de la ponderación se advirtió que los interceptos de las rectas de regresión ponderada eran más cercanos al cero, a diferencia de las rectas sin ponderar. En cuanto a las pendientes, hubo ligeros cambios en las rectas ponderadas. Con el cálculo ponderado los errores se modificaron, algunos incrementaron y otros disminuyeron. En resumen, aunque no hubieron grandes modificaciones en los parámetros estadísticos cuando se hizo la ponderación resultó importante hacer este tipo de cálculos, ya que con esto se obtuvieron valores de regresión

Resultados y discusiones

más cercanos a la realidad de los experimentos y se pudo estimar mejor el error, tanto en los parámetros estadísticos como en las concentraciones de analito que se deseara interpolar.

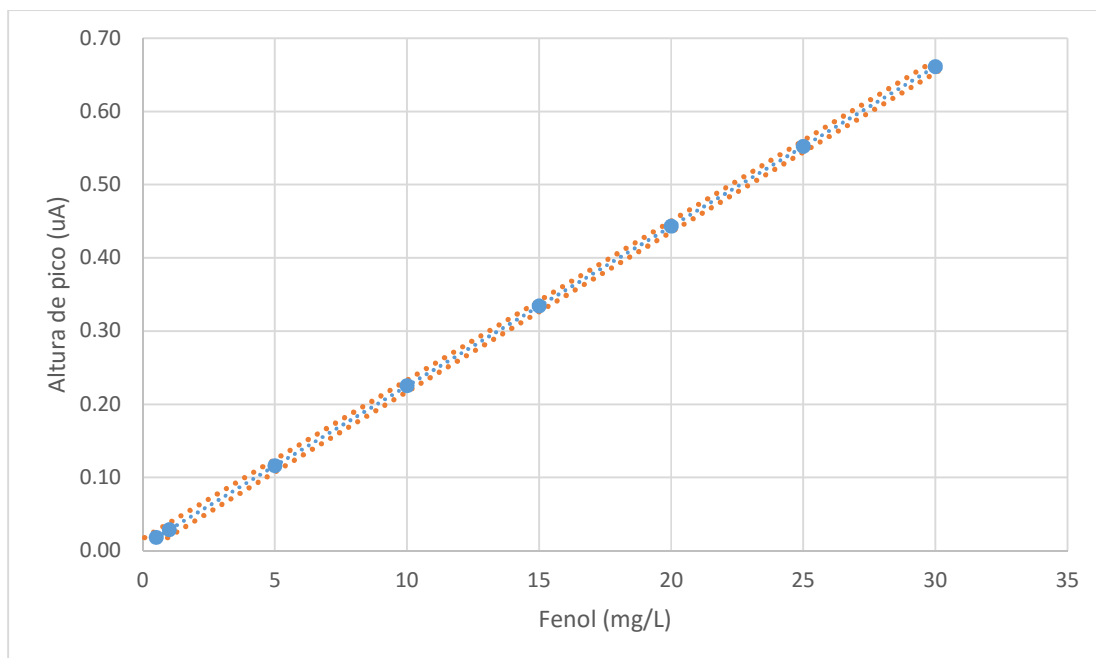


Figura 34. Recta de regresión ponderada $y=0.022x + 0.007$ con su intervalo de confianza

En cuanto a la diferencia de las rectas por cada analito, las pendientes obtenidas para el 2-clorofenol fueron ligeramente menores que para el fenol, lo que se tradujo en una menor sensibilidad para la determinación del primero. Esto también significó que al determinar 2-clorofenol con una curva de calibración de fenol se cometió error por defecto; sin embargo, con las rectas de regresión ponderada este error era menor en comparación con las no ponderadas, debido a que con la ponderación las pendientes obtenidas para el 2-clorofenol eran mayores.

5.3.3 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación, LD y LC se calcularon de acuerdo con lo indicado en la sección 4.3.3 Límites de detección y cuantificación. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 23.

Cuadro 23. Características del método analítico para la determinación de fenoles

Compuesto fenólico	LD (mg/L)	LC(mg/L)
Fenol	0.075	0.250
2-clorofenol	0.100	0.500

Resultados y discusiones

De acuerdo con las pendientes de las rectas ponderadas se puede observar que la mayor sensibilidad se obtuvo para el fenol. Además, para este analito, los LC y LD fueron más bajos. Esto es consecuencia de las diferentes sensibilidades obtenidas para ambos analitos, lo cual se refleja en la pendiente de las rectas de regresión, ya que las alturas de pico obtenidas para 2-clorofenol fueron menores.

5.3.4 Repetibilidad y reproducibilidad de la determinación de fenol y 2-clorofenol por FIA

Se hizo el estudio de la repetibilidad entre días e intra días para la determinación de fenol y 2-clorofenol por FIA. Para ello, se inyectó por triplicado durante 7 días un estándar de 15 mg/L de fenol preparado por duplicado y se determinó su concentración a partir de una curva de calibración preparada diariamente. Los resultados se muestran en el Cuadro 24.

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad se hizo un análisis de varianza de un factor para cada analito con base en las concentraciones determinadas. Como se explica en el Anexo 1, la técnica de análisis de varianza permite separar y estimar las diferentes causas de la variación, por lo que con ayuda de esta se pueden determinar la repetibilidad y reproducibilidad. Los cuadros de los análisis de varianza se muestran en los Cuadros 24 y 25.

Cuadro 24. Repetibilidad y reproducibilidad de fenol y 2-clorofenol por FIA

Día	Fenol		2-clorofenol	
	Réplica 1 (mg/L)	Réplica 2 (mg/L)	Réplica 1 (mg/L)	Réplica 2 (mg/L)
1	17.06	16.02	16.15	16.44
2	15.07	14.67	16.36	15.58
3	14.85	15.22	16.94	16.37
4	15.56	15.39	14.62	14.77
5	15.48	15.82	15.76	15.50
6	15.75	15.38	15.72	15.75
7	14.27	14.56	15.68	16.06

Cuadro 25. Análisis de varianza para la precisión entre e intra días de la determinación de fenol por FIA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre días	5.548042993	6	0.92467383
Dentro de días	0.874105552	7	0.12487222
Total	6.422148545	13	

Resultados y discusiones

Cuadro 26. Análisis de varianza para la precisión entre e intra días de la determinación de 2-clorofenol por FIA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre días	4.48955279	6	0.7482588
Dentro de días	0.62409582	7	0.08915655
Total	5.11364861	13	

El cálculo se hizo como se explicó en el apartado 4.3.2 Repetibilidad y reproducibilidad de la Metodología. Los resultados se muestran en el Cuadro 27.

Cuadro 27. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad para los analitos estudiados.

	Fenol	2-clorofenol
Repetibilidad (%)	2.30	1.89
Reproducibilidad (%)	4.72	4.09

A partir de estos resultados se observa que el sistema *FIA* empleado con el eluyente es preciso para la determinación de compuestos fenólicos. También se observa que la mejor repetibilidad y reproducibilidad se presentan para el 2-clorofenol, por lo que el método es más preciso; sin embargo, no se debe de olvidar que existe un error por defecto para la determinación por la menor sensibilidad que presentan las curvas de regresión para este analito.

5.3.5 Mejores condiciones para la preconcentración de fenol con *Lichrolut EN*

Para tratar de mejorar la preconcentración de fenol se siguió el procedimiento sugerido por Gutiérrez Pulido y de la Vara Salazar [44] usando superficies de respuesta y la optimización con múltiples variables respuesta, tal como se explicó previamente en la parte de Optimización.

5.3.5.1 Diseño 1: factorial fraccionado 2^{4-1} sin réplicas

De manera preliminar, se estudió el efecto de cuatro variables: caudal de carga, volumen de carga, volumen de elución y composición de la fase eluyente. El caudal de elución se fijó a 0.5 mL/min, ya que este parámetro corresponde al caudal al cual fluye la muestra en la configuración *FIA* empleada para la determinación de fenoles totales. Además, se decidió dejar fijo el factor "longitud de la columna" a 3 cm. Esto fue consecuencia del menor tamaño de partícula de *Lichrolut EN*, lo que ocasionó que con esta longitud existieran algunos problemas de presión en la columna y se provocaran fugas en el sistema. Asimismo, se

Resultados y discusiones

decidió incluir como factor la “composición del eluyente”, para estudiar cómo afectaba a las otras variables y para confirmar el valor óptimo.

Cuadro 28. Matriz experimental para el diseño factorial 2⁴⁻¹

	Factor			
Experimento	A	B	C	D=+ABC
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-

Cuadro 29. Factores y niveles evaluados para el diseño factorial 2⁴⁻¹

Factor	Descripción	Unidades	-	+
A	Caudal de carga	mL/min	1	2
B	Volumen de carga	mL/min	5	10
C	Volumen de elución	mL	0.25	0.5
D	Composición del eluyente ⁸	% MeOH	0	20

Para determinar los factores más significativos en la preconcentración, se generó el diagrama de Pareto (Figura 35).

En el diagrama de Pareto se observó que los efectos más significativos fueron el volumen de elución y la composición del eluyente, seguidos del volumen y caudal de carga y todos tuvieron un efecto positivo en la preconcentración. El volumen de elución tuvo un efecto positivo a causa de que por ser una columna corta y a la capacidad del eluyente de desorber al fenol, al aumentar el volumen de elución fue posible desorber más analito. Sin embargo, si aumentara más este volumen sería posible que en lugar de eluir más fenol éste solamente se diluyera. En lo que concierne a la composición del diluyente, se sabe que el *Lichrolut EN* es hidrofóbico, por lo que la adición de un disolvente orgánico favorece la interacción de la fase estacionaria con la extractante y, por tanto, que las moléculas de analito puedan ser eluidas; no obstante, la cantidad de metanol añadida está limitada debido a la producción de burbujas en el sistema, debido a la disolución del metanol en NaOH 0.1 M. En cuanto al volumen de carga, ya se ha discutido previamente este efecto positivo: si no se ha llegado al volumen de fuga, si se introdujera una mayor cantidad de muestra en la columna habría un mayor número de moléculas que pudieran ser adsorbidas. En cuanto al caudal de carga, tuvo un efecto positivo ya que con los niveles probados las moléculas de fenol tienen

⁸ Composiciones probadas: NaOH 0.1 M y mezcla MeOH 20% en NaOH 0.1 M

Resultados y discusiones

suficiente tiempo de interactuar con la fase sólida y así quedar retenidas; sin embargo, si este aumentara podría ocurrir que no se llevaran a cabo estas interacciones y que el analito no fuera retenido.

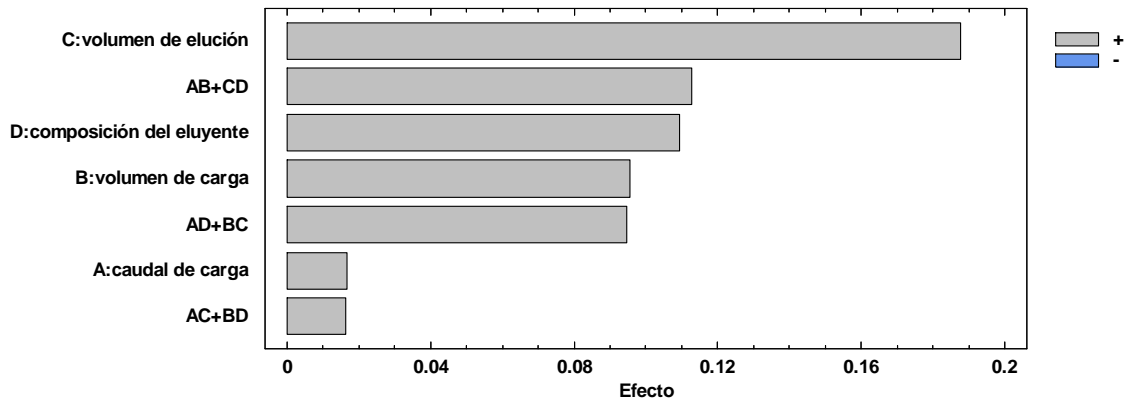


Figura 35. Diagrama de Pareto para los efectos del diseño factorial 2^{4-1}

Por último, ya que se hubo probado en experimentos anteriores que la preconcentración dependía, principalmente, del volumen de carga y que variaba de acuerdo con la velocidad de carga, se decidió hacer más experimentos en los que se estudiaran estas dos variables. En el caso del volumen y el caudal de elución se decidió usar como valores óptimos los de 500 μL a 0.5 mL/min.

5.3.5.2 Diseño 2: factorial 2^2 duplicado con un punto central

En este estudio se evaluó el efecto de las variables caudal de carga y volumen de carga en la preconcentración. Para ello se empleó un diseño factorial 2^2 duplicado con un punto central y los valores de las variables volumen y caudal de carga se aumentaron, a fin de incrementar la preconcentración con *Lichrolut EN*, ya que en el experimento anterior se concluyó que al aumentar estas variables se aumentaba la respuesta. La matriz experimental, así como los factores estudiados, se muestran en los Cuadros 30 y 31. Para todos los casos la concentración inicial empleada fue de 0.1 mg/L.

Cuadro 30. Matriz experimental para el diseño factorial 2^2 duplicado con un punto central

Experimento	Factor	
	A	B
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0

Cuadro 31. Factores y niveles evaluados para el diseño factorial 2² duplicado con un punto central

Factor	Descripción	-	+
A	Caudal carga (mL/min)	2	4
B	Volumen de carga (mL)	20	40

Para determinar los factores más significativos en la preconcentración, se generó el diagrama de Pareto con un nivel de confianza del 95% (Figura 36).

Se observa que el factor experimental más significativo fue el volumen de carga, el cual es mayor al error estándar, tal como se observa en el diagrama de Pareto. Por otra parte, el caudal de carga dejó de ser un factor significativo en cuanto a la preconcentración. De esto se concluye que, a volúmenes mayores, bajo estas condiciones, este efecto deja de ser significativo, pero como sí lo fue en cuanto al tiempo de análisis, se siguió evaluando para fines de la optimización; además de que se estudió cómo afecta a la respuesta “tiempo de análisis”, la cual se incluyó en los resultados de los experimentos descritos más adelante.

Cabe destacar que, con ayuda del punto central estudiado, no se detectó curvatura en este modelo, es decir, no se encontraron efectos cuadráticos. Esto significa que el valor óptimo no se encontraba en la región experimental probada, por lo que se debieron de seguir probando condiciones a fin de hallar este valor.

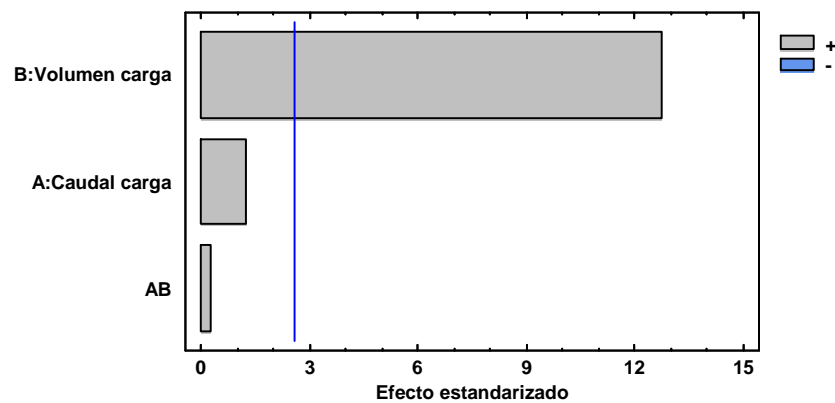


Figura 36. Diagrama de Pareto estandarizado para los efectos para el diseño factorial 2² duplicado con un punto central

De todo lo anterior, se concluye que, bajo las condiciones probadas en este experimento, las mejores condiciones halladas fueron las que se muestran en el Cuadro 32.

Resultados y discusiones

Cuadro 32. Mejores valores hallados en el experimento factorial 2² duplicado con un punto central

Factor	Bajo	Alto	Máximo
Caudal carga (mL/min)	2.0	4.0	4.0
Volumen carga (mL)	20.0	40.0	40.0

Los factores de preconcentración obtenidos se muestran en el Cuadro 32.

Cuadro 33. Factores de preconcentración obtenidos en el experimento factorial 2² duplicado con un punto central

Experimento	Caudal (mL/min)	Volumen de carga (mL)	Concentración calculada (mg/mL)	Factor de preconcentración
1	2	20	1.71	17.10
			1.41	14.05
2	4	20	1.86	18.63
			1.62	16.17
3	2	40	4.12	41.17
			3.75	37.52
4	4	40	4.41	44.14
			4.03	40.26
5	3	30	3.67	36.66
			2.89	28.90

Como se observa en la tabla de arriba, el mayor factor de preconcentración obtenido fue de 44.14, el cual correspondió a la mejor combinación de niveles de factor obtenida de acuerdo con el análisis estadístico.

5.3.5.3 Diseño 3: factorial 2² triplicado con un punto central

Para mejorar los factores de preconcentración obtenidos se decidió probar con volúmenes de carga mayores; sin embargo, esto se tradujo en un mayor tiempo de preconcentración, por lo que también se decidió probar caudales mayores.

La matriz del experimento es la misma que la mostrada en el Cuadro 30. Los niveles para cada factor se muestran en el Cuadro 34.

Para todos los casos la concentración inicial empleada fue de 0.1 mg/L.

Para determinar los factores más significativos en la preconcentración, se generó el diagrama de Pareto con un nivel de confianza del 95% (Figura 37).

Cuadro 34. Factores y niveles evaluados para el diseño factorial 2²

Factor	Descripción	-	+
A	Caudal carga (mL/min)	3	5
B	Volumen de carga (mL)	40	60

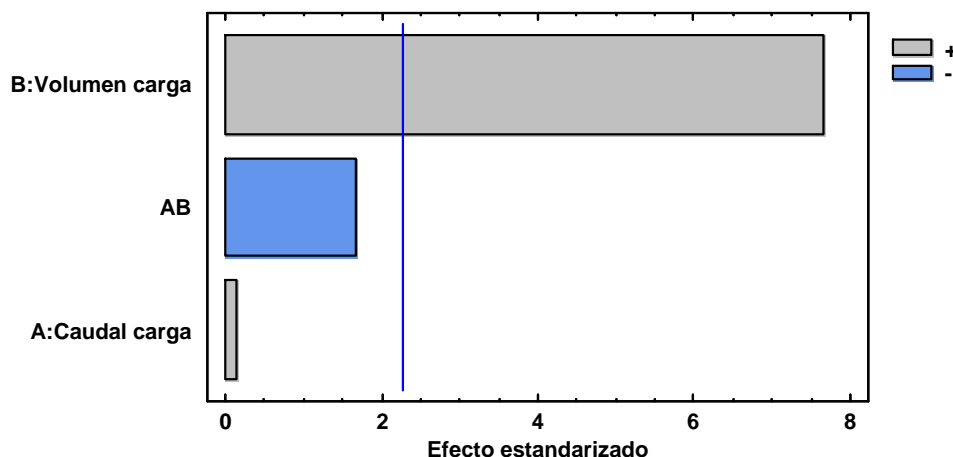


Figura 37. Diagrama de Pareto para el diseño factorial 2²

De la misma manera que en el experimento anterior, se observó que el efecto más significativo fue el volumen de carga, el cual era mayor al error estándar, tal como se observa en el diagrama de Pareto. Se concluyó que debían probarse volúmenes aún mayores.

Asimismo no se detectó curvatura en el modelo, tal como en el experimento anterior.

En el Cuadro 35 se muestran los factores de preconcentración obtenidos en este experimento. Se observa que el mayor factor de concentración obtenido fue 63.76, el cual fue mayor al máximo obtenido en el experimento anterior.

Cuadro 35. Factores de preconcentración obtenidos en el experimento factorial 2² triplicado con un punto central

Experimento	Caudal de carga (mL/min)	Volumen de carga (mL)	Concentración calculada (mg/L)	Factor de preconcentración
1	3	40	3.30	33.01
			3.55	35.49
			3.13	31.33
2	5	40	3.79	37.93
			4.56	45.63
			3.18	31.81

Resultados y discusiones

Experimento	Caudal de carga (mL/min)	Volumen de carga (mL)	Concentración calculada (mg/L)	Factor de preconcentración
3	3	60	5.62	56.16
			6.38	63.76
			5.96	59.64
4	5	60	5.67	56.70
			5.4	54.03
			5.58	55.76
5	4	50	4.62	46.20
			3.66	36.65
			4.35	43.55

5.3.5.4 Diseño 4: factorial 2² duplicado con un punto central

En esta parte se repitió el experimento anterior, pero a caudales y volúmenes mayores. El volumen de carga se aumentó, ya que en el experimento anterior se observó que al aumentarlo mejoraba la preconcentración, el caudal se aumentó para disminuir el tiempo de análisis, ya que se vio que no tenía un efecto significativo en la preconcentración. Esta vez se incluyó el tiempo como una respuesta y se hizo una optimización simultánea de la concentración de fenol y del tiempo de preconcentración. Para ello se empleó un diseño factorial 2² duplicado con un punto central. La matriz experimental, así como los factores estudiados, se muestran en el Cuadro 30 y el Cuadro 36. Para todos los casos la concentración inicial fue de 0.1 mg/L.

Cuadro 36. Factores y niveles evaluados para el diseño factorial 2² con un punto central

Factor	Descripción	-	+
A	Caudal carga (mL/min)	3	5
B	Volumen de carga (mL)	50	100

Para ver determinar los factores significativos en la preconcentración, se generó el diagrama de Pareto con un nivel de confianza del 95% (Figura 38).

Resultados y discusiones

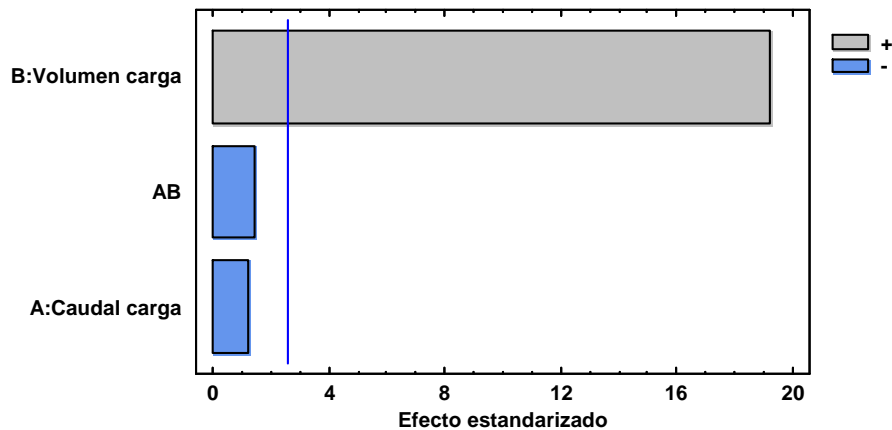


Figura 38. Diagrama de Pareto estandarizado para los efectos para el diseño factorial 2^2 con un punto central para la variable respuesta preconcentración

Se observa el mismo comportamiento que en los experimentos anteriores.

Para el caso de la variable respuesta tiempo también se hizo un análisis de los resultados y para ello también se generó un diagrama de Pareto con un nivel de confianza al 95%, el cual se muestra en la Figura 39.

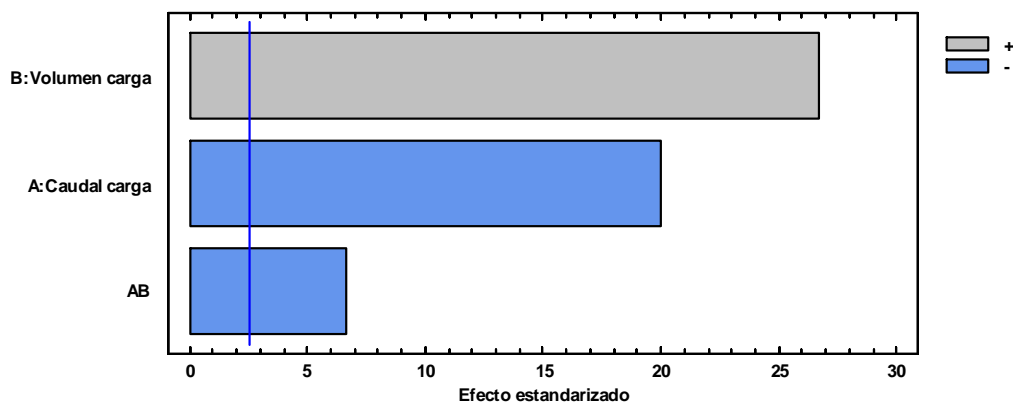


Figura 39. Diagrama de Pareto estandarizado para los efectos para el diseño factorial 2^2 con un punto central para la variable respuesta tiempo

Como se puede observar, el factor que más afectó al tiempo de preconcentración fue el volumen de carga, ya que al aumentarlo igualmente se prolongó el tiempo de análisis; sin embargo, también fue la variable que más afectó a la preconcentración y al aumentarla, se incrementó la preconcentración. Por otra parte, al aumentar el caudal de carga el tiempo de preconcentración disminuyó, por lo que se concluye que lo conveniente era usar el caudal más alto a fin de disminuir el tiempo de preconcentración.

Resultados y discusiones

En el Cuadro 38 se muestran los factores de preconcentración obtenidos en este experimento. Se observa que el mayor factor de concentración obtenido fue 63.76, el cual es mayor al máximo obtenido en el experimento anterior

De forma análoga, se aplicó la optimización de múltiples respuestas, a fin de maximizar la preconcentración minimizando el tiempo de análisis y, de esta manera, se definió la función deseabilidad. La función deseabilidad es la función de los factores que transforman los valores predichos por el modelo a una escala [0, 1], para indicar qué tan deseables son [44].

Se buscó maximizar la función deseabilidad. Los resultados se muestran en el Cuadro 37.

Los factores de preconcentración obtenidos se muestran en el Cuadro 38.

Cuadro 37. Valores máximos encontrados para el diseño factorial 2² con un punto central

Factor	Bajo	Alto	Máximo
Caudal carga (mL/min)	3.0	5.0	5.0
Volumen carga (mL)	50.0	100.0	100.0

Cuadro 38. Factores de preconcentración obtenidos

Experimento	Caudal de carga (mL/min)	Volumen de carga (mL)	Concentración calculada (mg/L)	Tiempo (min)	Factor de preconcentración
1	3	50	10.00	20.67	100.05
6	3	50	9.47	20.67	94.71
5	5	50	9.30	14.00	93.03
10	5	50	10.32	14.00	103.24
2	3	100	17.89	37.33	178.90
7	3	100	17.65	37.33	176.48
3	5	100	17.29	24.00	172.95
8	5	100	16.22	24.00	162.22
4	4	75	14.27	22.75	142.66
9	4	75	13.37	22.75	133.70

Además, se obtuvo la superficie de respuesta de la función de deseabilidad, que se presenta en la Figura 40.

Como se observa en el Cuadro 38, los mayores factores de preconcentración obtenidos fueron 178.90 y 176.48, y corresponde a un tiempo de análisis de 37.33 min; en segundo lugar quedan los factores de preconcentración de 172.95 y 162.22, con un tiempo de

Resultados y discusiones

análisis de 24 min. Se observa que la diferencia en los factores de preconcentración no es tan grande como la diferencia en tiempo de preconcentración.

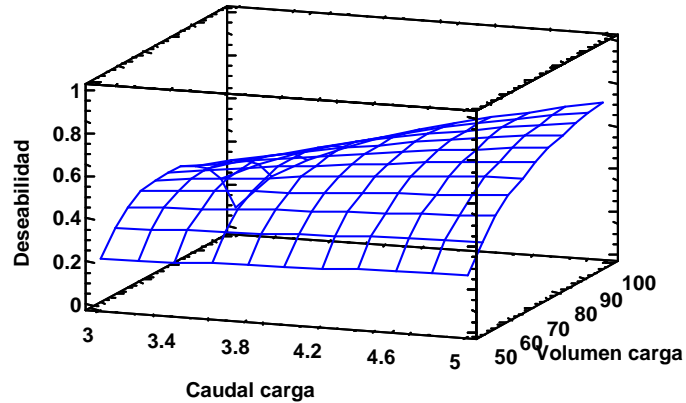


Figura 40. Superficie de respuesta para la función deseabilidad para caudal y volumen de carga

Por otro lado, por medio de la optimización de múltiples respuestas, se concluyó que las mejores condiciones eran cargar 100 mL de muestra a 5.00 mL/min para obtener las mayores preconcentraciones en el menor tiempo posible, que corresponden a los factores de preconcentración de 172.95 y 162.22, los segundos más altos del experimento.

5.3.5.5 Estudio del volumen de elución

Por otra parte, en un experimento univariante posterior bajo las condiciones óptimas de preconcentración se estudió el volumen de elución óptimo en un experimento aleatorizado. Los resultados se muestran en la Figura 41.

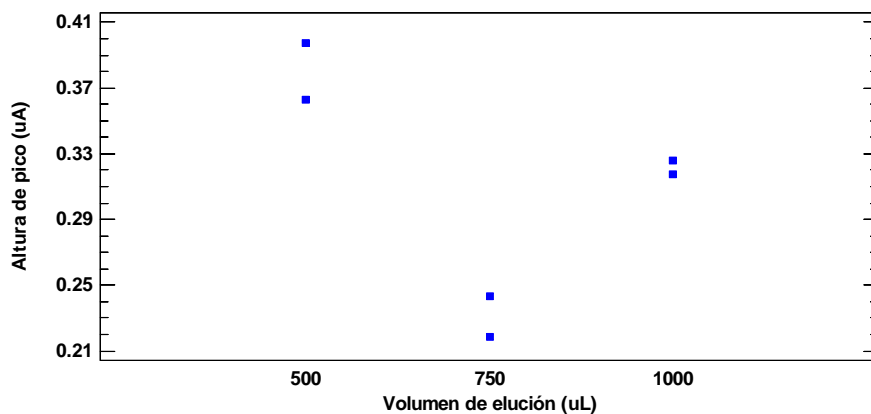


Figura 41. Volumen de elución para columna de *Lichrolut EN*

Resultados y discusiones

Como se puede observar, el mejor volumen fue con 500 μL , lo cual coincidió con el valor máximo encontrado en la optimización, por lo que se confirmó que era el valor óptimo.

Se concluyó que la secuencia óptima de preconcentración es la mostrada en el Cuadro 39.

Cuadro 39. Secuencia optimizada para la preconcentración de fenol con *Lichrolut EN*

Etapa	Posición de válvulas		Canal				Fluido alimentado a la columna
	Solenoide	De inyección	Eluyente ⁹		HCl 0.01 F/Muestra		
			Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	Caudal (mL/min)	Volumen (mL)	
Acondicionamiento	Encendido	Carga	0.05	0.05	2.00	2.00	HCl
Carga de muestra	Apagado	Carga	0.05	1.00	5.00	100.00	Muestra
Lavado	Encendido	Carga	0.05	0.10	1.00	2.00	HCl
Elución	Encendido	Inyección	0.50	0.50	0.05	0.100	Eluyente

5.3.6 Estudio de la preconcentración de fenol y 2-clorofenol con *Lichrolut EN*

El estudio de la preconcentración de fenol y 2-clorofenol se llevó a cabo a diferentes concentraciones iniciales para evaluar los factores de preconcentración. Se hicieron diferentes gráficas, la primera fue la curva de calibración para la preconcentración de estos analitos, que se presenta en la Figura 42. El intervalo de concentraciones iniciales para ambos compuestos fue de 0.001-0.1 mg/L.

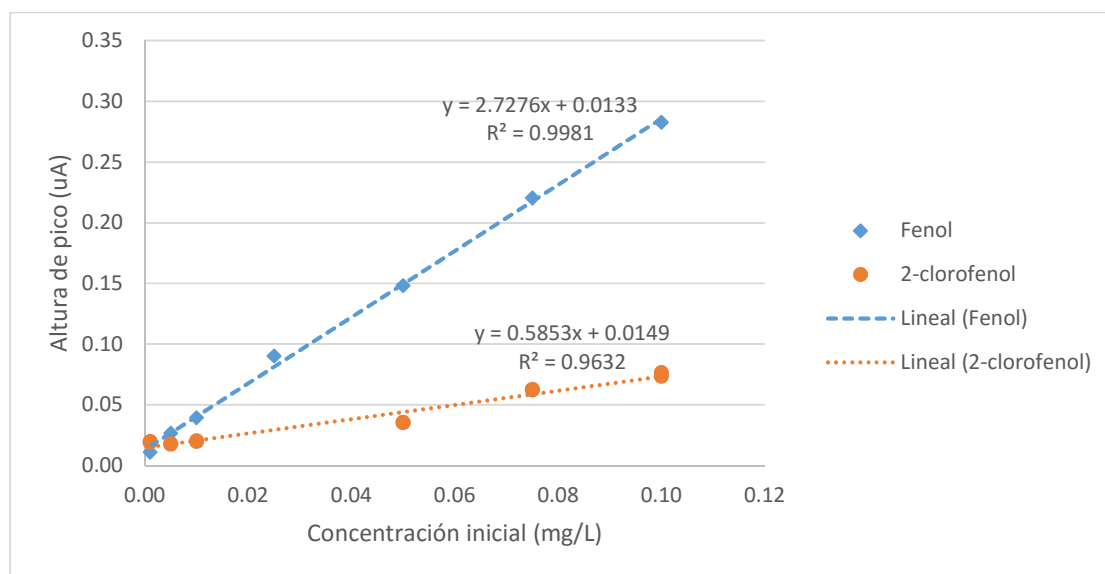


Figura 42. Curva de calibración de preconcentración de compuestos fenólicos

⁹ NaOH 0.1 M en MeOH 20% v/v

Resultados y discusiones

A partir de la curva de preconcentración para el fenol (Figura 42 y Cuadro 40), se hizo la interpolación de los datos de preconcentración.

Cuadro 40. Estadísticos y su error para las curvas de preconcentración de fenol y 2-clorofenol

Analito	Intercepto (uA)	Error (uA)	Pendiente (uA·L/mg)	Error (uA·L/mg)	R ²
Fenol	0.013	2.8×10^{-3}	2.73	5.3×10^{-2}	0.9981
2-clorofenol	0.015	2.0×10^{-3}	0.59	3.6×10^{-2}	0.9632

En la Figura 43 se observó que los mayores factores de preconcentración se obtuvieron para 2-clorofenol cuando las concentraciones iniciales eran menores, pero a concentraciones iniciales mayores la situación se invirtió. En general, la preconcentración fue mayor para el fenol, en el intervalo estudiado, fue de 130 a 300 veces, mientras que para el 2-clorofenol fue de 35 a 650 veces. Con estos factores de preconcentración se pudieron determinar fenoles en muestras de agua con concentraciones <0.3 mg/L, el cual es el límite máximo permitido por la modificación de la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994.

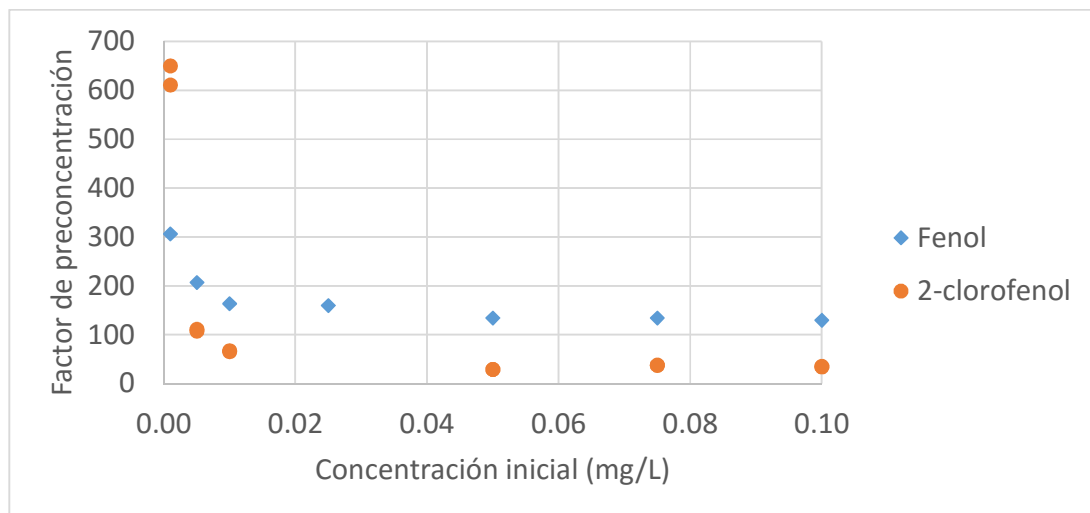


Figura 43. Factor de preconcentración de fenoles vs. concentración inicial

Para poder correlacionar las concentraciones inicial y final de los analitos se construyó la gráfica que relacionaba ambas variables para poder hacer estimaciones, la cual se presenta en la Figura 44.

Resultados y discusiones

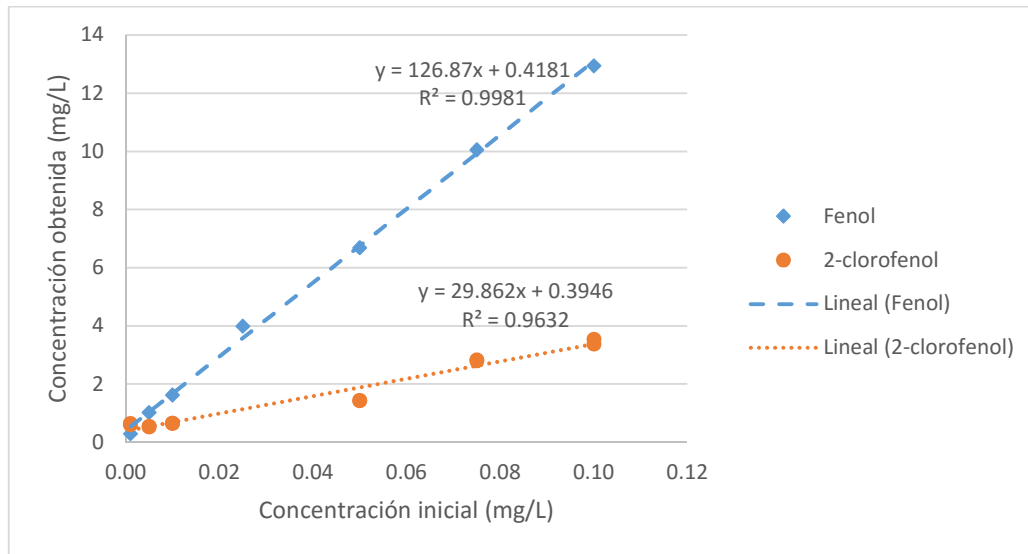


Figura 44. Gráfica de concentración inicial vs. concentración final de los diferentes analitos estudiados

Para cada recta de regresión se realizó un análisis de varianza a fin de determinar si estadísticamente había una relación lineal entre ambas variables. Para el caso de la preconcentración de fenol, el análisis de varianza se muestra en Cuadro 41, mientras que para el 2-clorofenol se muestra en el Cuadro 42.

Cuadro 41. Análisis de varianza para la preconcentración de fenol con *Lichrolut EN*

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	141.136	1	141.136	2603.50	0.0000
Residuo	0.27105	5	0.05421		
Total (Corr.)	141.407	6			

Cuadro 42. Análisis de varianza para la preconcentración de 2-clorofenol con *Lichrolut EN*

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	15.2854	1	15.2854	261.64	0.0000
Residuo	0.584222	10	0.0584222		
Total (Corr.)	15.8697	11			

Tanto para el caso del fenol como para el 2-clorofenol el valor-P en el análisis de varianza fue menor de 0.05, lo que indicó que había una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95.0%, por lo que pudo afirmarse que en ambos casos la correlación era lineal. Además, a partir de estas gráficas se pudo calcular la concentración inicial de los analitos en muestras de agua que habían sido preconcentradas.

Resultados y discusiones

Se calcularon las eficiencias de la misma forma en la que se procedió para la Amberlita XAD-4. Los resultados se presentan en la Figura 45. Como se observa, para fenol las eficiencias oscilaron entre 65 y 153%, correspondiendo a las concentraciones iniciales de 0.1 y 0.001 mg/L, respectivamente, mientras que para 2-clorofenol las eficiencias variaron entre 17.33 y 316% para 0.1 y 0.001 mg/L, respectivamente.

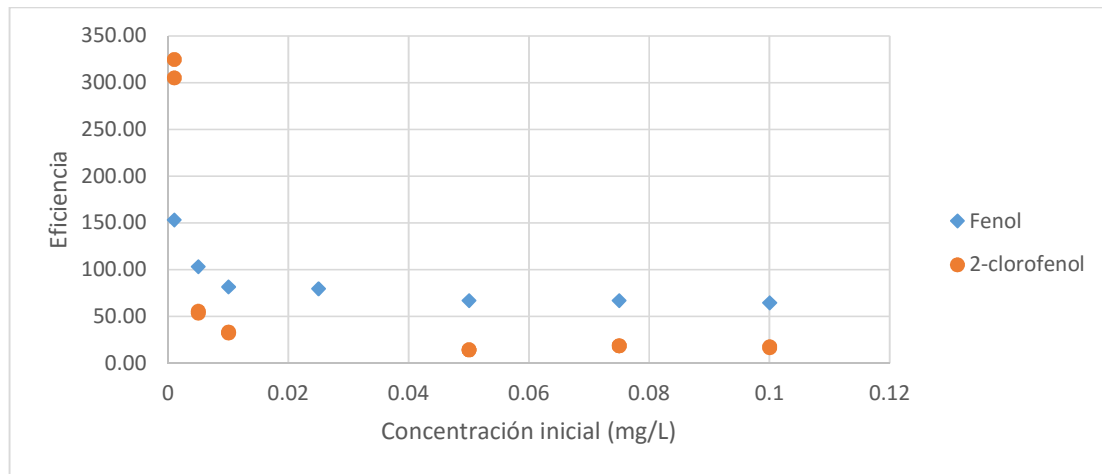


Figura 45. Eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos con *Lichrolut EN*

Además, se estudió la precisión como repetibilidad para la preconcentración de fenol. Para esto, se preconcentraron siete disoluciones con concentraciones iniciales de 0.1 mg/L, a fin de obtener una concentración final cercana a 15 mg/L. Posteriormente, se procedió a hacer la preconcentración con la secuencia optimizada y se obtuvieron las respuestas de altura de pico. Con las alturas de pico y una curva de calibración de 0.5-30.0 mg/L se calcularon las concentraciones finales obtenidas con ayuda de una curva de calibración y se obtuvo una media de 14.15 mg/L, una desviación estándar de 1.25 mg/L y una desviación estándar relativa (DER) de 7.95%.

A manera de resumen se hizo una comparación de los resultados obtenidos con los dos adsorbentes empleados en esta investigación, la cual se muestra en el Cuadro 43.

Cuadro 43. Comparativo de preconcentración de compuestos fenólicos con Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*

Adsorbente	Analito	Intervalo de concentraciones (mg/L)	Intervalo de factores de preconcentración obtenidos	Intervalo de eficiencia de extracción (%)
Amberlita XAD-4	Fenol	0.4-1.0 mg/L	5.74-4.15	5.74-4.15
	2-clorofenol	0.4-0.9 mg/L	8.58-6.23	5.74-4.02
<i>Lichrolut EN</i>	Fenol	0.001-0.1	306.51-129.53	153.26-64.77
	2-clorofenol	0.001-0.1	610.71-33.89	305.36-16.95

Resultados y discusiones

En este cuadro se observa que los mayores factores de preconcentración se obtuvieron con *Lichrolut EN*, además de que con este adsorbente se obtuvieron mejores eficiencias de extracción y se pudo trabajar en un intervalo más amplio de concentraciones iniciales de compuesto fenólico. Este comportamiento era de esperarse, ya que ha sido reportado por otros autores [28]. Se cree que el mejor desempeño del *Lichrolut* como fase adsorbente se debe a lo más altos volúmenes de fuga que presenta, permitiendo obtener mayores factores de preconcentración y límites de detección más bajos.

En cuanto a las diferencias entre las preconcentraciones de ambos analitos, se obtuvieron mayores factores de preconcentración para 2-clorofenol; esto se debe a su K_{ow} , lo que hizo que fuera más afín a la fase estacionaria y sea pudiera retenerse mejor. Este comportamiento ha sido también reportado en otros trabajos [7,28].

Finalmente, cuando se emplea *Lichrolut EN* se observa que existen diferencias muy grandes entre los factores de concentración y eficiencias obtenidos con los diferentes analitos probados, contrario a lo observado con Amberlita XAD-4. Esto se explica si se toma en cuenta el tamaño de poro de *Lichrolut EN* debido al alto grado de entrecruzamiento que presenta. Esto ocasiona que el tamaño de poro sea menor, lo que ocasiona que el adsorbente funcione como un tamiz molecular, ya sea permitiendo o restringiendo el acceso a la superficie interior de acuerdo con el tamaño del analito; esto dificulta la retención de moléculas grandes.

6. Conclusiones

En este trabajo se logró implementar un método analítico para la determinación de compuestos fenólicos acoplando la preconcentración en línea a una configuración de flujo continuo.

Asimismo, se maximizaron los efectos de las condiciones de pH y concentración de la disolución amortiguadora amoniaca. Se encontró que a pH 9 con concentración 0.3 M se obtiene una mayor altura de pico cuando se hace la reacción del fenol con la 4-AAP.

Además, se estableció como intervalo de trabajo para la determinación de fenoles de 0.5 a 30 mg/L, con un LD de 0.075 mg/L para fenol y de 0.100 para 2-clorofenol. Se obtuvo que la repetibilidad para los analitos fue de 2.30 y 1.89 para fenol y 2-clorofenol mientras que la reproducibilidad fue de 4.72 y 4.09, respectivamente.

Para la preconcentración en fase sólida se probaron dos fases adsorbentes: Amberlita XAD-4 y *Lichrolut EN*, ambas con estructuras químicas muy similares. Se encontró que para la elución de los analitos cuando se empleaba *Lichrolut EN* como fase sólida se requería una mezcla de MeOH 20% v/v en NaOH 0.1 M. Igualmente, se determinó que la longitud óptima para la columna de Amberlita XAD-4 fue de 11 cm, mientras que para *Lichrolut EN* fue de 3 cm. Cuando las curvas de calibración se prepararon con NaOH 0.1 M disuelto en MeOH 20% v/v, los datos generados presentaron heterocedasticidad, por lo que se aplicó la regresión por mínimos cuadrados ponderada y con ésta fue posible determinar las concentraciones de fenol después de la preconcentración.

Se estudiaron las variables que afectan la preconcentración de fenol por extracción en fase sólida mediante diseños factoriales y se encontraron las condiciones que permitieran maximizar la preconcentración. Para Amberlita XAD-4 se encontró que la máxima recuperación se daba cuando fueron cargados 50 mL de muestra disuelta en HCl 0.01 M a 2 mL/min y se eluyeron a 500 μ L con NaOH 0.1 M a 0.5 mL/min, mientras que para *Lichrolut EN* se encontró que se maximizaba la recuperación cuando se cargaban 100 mL de muestra a 5 mL/min y se eluían en MeOH 20 %v/v en NaOH 0.1 M con 500 μ L a 0.5 mL/min.

Adicionalmente, los mayores factores de preconcentración se lograron empleando *Lichrolut EN* como fase sólida. La ventaja de utilizar Amberlita XAD-4 es su compatibilidad con la configuración *FIA* propuesta en esta investigación, ya que no se requieren disolventes orgánicos para la preconcentración en línea, permitiendo preconcentrar compuestos fenólicos de diferente tamaño, además de su menor costo comparado con el *Lichrolut EN*.

Conclusiones

Éste último permite obtener mayores preconcentraciones; sin embargo, existen variaciones importantes al comparar los resultados obtenidos con cada uno de los fenoles probados. El tiempo total de análisis con el *Lichrolut EN* fue de 24 min, lo que permite preconcentrar 2.5 muestras por hora.

7. Perspectivas a futuro

Es necesario hacer un estudio de las posibles interferencias en la preconcentración de fenol, a fin de minimizarlas y, si es posible, eliminarlas. Estas interferencias pueden ser por la presencia de iones hipoclorito, sulfato, amonio, fosfato, potasio, calcio, sodio, magnesio, manganeso, hierro (III), cobre (II) y acetato [3,27].

Una vez validado el método analítico para la preconcentración y determinación de fenoles totales se puede hacer el análisis de muestras reales de agua potabilizada y aguas residuales tratadas.

Adicionalmente, se puede miniaturizar aún más el método y transferirlo a análisis por inyección secuencial (*SIA* por sus siglas en inglés) y, posteriormente, separar los compuestos y cuantificarlos por cromatografía de inyección secuencial (*SIC* por sus siglas en inglés), la cual es compatible con la preconcentración de fenoles por *SPE* con *Lichrolut EN* como adsorbente, ya que se puede mejorar la preconcentración al eluir con un mayor porcentaje de MeOH, lo cual aumentaría el factor de preconcentración.

8. Referencias

- [1] R.M. Clark, B.K. Boutin, Controlling Disinfection By-Products and Microbial Contaminants in Drinking Water, 2001.
- [2] B.G. Corominas, J.V.G. Mateo, L.L. Zamora, J.M. Calatayud, Determination of phenol by preconcentration-direct chemiluminescence in a FIA assembly, *Anal. Lett.* 38 (2005) 499-510.
- [3] E.G. Carrillo-Cedillo, M.P. Haro-Vázquez, G.C. Díaz-Trujillo, M.P. Cañizares-Macías, Plackett-Burman factorial design for the optimization of a spectrophotometric flow injection method for phenol determination in tap and bottled water using 4-aminoantipyrine, *J. Mex. Chem. Soc.* 58 (2014) 99-105.
- [4] V. Cerdà, A. Cerdà, J.M. Estela, Métodos automáticos para el análisis de trazas, en: C. Cámara, C. Pérez-Conde (Eds.), *Análisis químico de trazas*, Editorial Síntesis, 2011: pp. 338-346.
- [5] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Flow analysis techniques as effective tools for the improved environmental analysis of organic compounds expressed as total indices, *Talanta.* 81 (2010) 1-8.
- [6] P. Patnaik, Phenols, en: *Handb. Environmental Anal. Chem. Pollut. Air, Water, Soil, Solid Wastes.*, 2º ed., Taylor and Francis Group, LLC, 2010: pp. 337-338.
- [7] Y. Ku, K.C. Lee, Removal of phenols from aqueous solution by XAD-4 resin, *J. Hazard. Mater.* 80 (2000) 59-68.
- [8] S. Satienperakul, S.Y. Sheikheldin, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, M.D. Luque de Castro, I.D. McKelvie, et al., Pervaporation-flow injection analysis of phenol after on-line derivatisation to phenyl acetate, *Anal. Chim. Acta.* 485 (2003) 37-42.
- [9] C.N. Sawyer, P.L. McCarty, G.F. Parkin, *Química para ingeniería ambiental*, 4ta ed., McGraw-Hill, Colombia, 2001.
- [10] J. Ružička, E.H. Hansen, Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta.* 78 (1975) 145-157.

Referencias

- [11] E.H. Hansen, M. Miró, How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses, *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 18-26.
- [12] G.D. Christian, *Química analítica*, 6° ed., McGraw-Hill, 2009.
- [13] G.D. Christian, Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences, *Anal. Chim. Acta.* 499 (2003) 5-8. doi:10.1016/S0003-2670(03)00360-X.
- [14] J. Ružička, E.H. Hansen, *Flow injection analysis*, 2° ed., John Wiley & Sons, Inc., 1988.
- [15] E. Emerson, The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds, *J. Org. Chem.* 08 (1943) 417-428.
- [16] A.D. Eaton, L.S. Clescen, E.W. Rice, A.E. Greenberg, eds., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed., American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 2005.
- [17] NMX-AA-050-SCFI-2001 *Análisis de agua - Determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - Método de prueba (cancela a la NMX-AA-050-1981)*, 2001.
- [18] J. Möller, M. Martin, Determination of phenol in water by flow injection analysis, *Fresenius Z. Anal Chem.* 329 (1988) 728-731.
- [19] L.G. Wade, *Química orgánica*, 5a ed., Pearson Educación, Madrid, 2004.
- [20] W. Cao, X. Mu, J. Yang, W. Shi, Y. Zheng, Flow injection-chemiluminescence determination of phenol using potassium permanganate and formaldehyde system, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 66 (2007) 58-62.
- [21] R.G. Dolatto, I. Messerschmidt, C.A.P. Silveira, G. Abate, Determination of phenol and o-cresol in soil extracts by flow injection analysis with spectrophotometric detection, *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012) 970-976.

Referencias

- [22] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, I.V.O.S. Pinto, Determination of phenolic compounds in waste waters by sequential injection analysis and spectrophotometry, *Int. J. Environmental Anal. Chem.* 76 (2000) 69-76.
- [23] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, I.V.O.S. Pinto, Simultaneous determination of nitrite, nitrate, sulphate and phenolic compounds, by sequential injection analysis, in wastewaters, *Analisis.* 28 (2000) 295-301.
- [24] K.O. Lupetti, F.R.P. Rocha, O. Fatibello-Filho, An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry, *Talanta.* 62 (2004) 463-7.
- [25] W.L. Song, Z.L. Zhi, L.S. Wang, Amberlite XAD resin solid-phase extraction coupled on-line to a flow injection approach for the rapid enrichment and determination of phenols in water and waste waters, *Talanta.* 44 (1997) 1423-33.
- [26] H. Qi, J. Lv, B. Li, Determination of phenol at ng l⁻¹ level by flow-injection chemiluminescence combined with on-line solid-phase extraction, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 66 (2007) 874-8.
- [27] Z. Zhi, A. Ríos, M. Valcárcel, Continuous-flow methods for the determination of phenols at low levels in water and soil leachates using solid-phase extraction for simultaneous preconcentration and separation, *Analyst.* 121 (1996) 2-7.
- [28] H.M. Oliveira, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, Automatic flow system for evaluation of polystyrene-divinylbenzene sorbents applied to preconcentration of phenolic pollutants, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (2011) 884-899.
- [29] H.M. Oliveira, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Multi-syringe flow injection system with in-line pre-concentration for the determination of total phenolic compounds, *Microchim. Acta.* 150 (2005) 187-196.
- [30] R. Izquierdo, C. del Cacho, *Determinación de compuestos orgánicos*, Editorial Reverté, Madrid, 2011.

Referencias

- [31] A. Martín-Esteban, P. Fernández-Hernando, Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos, en: C. Cámara (Ed.), Toma y Trat. muestras, Editorial Síntesis, Madrid, 2004: pp. 291-303.
- [32] S. Mitra, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Wiley & Sons, New Jersey, 2003.
- [33] M.-C. Hennion, P. Scribe, Chapter 2. Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples, Tech. Instrum. Anal. Chem. 13 (1993) 23-77.
- [34] L. Ramos, M. Pena, Miniaturización en la preparación de muestras, en: C. Cámara, C. Pérez-Conde (Eds.), Análisis químico de trazas, Editorial Síntesis, 2011: pp. 299-309.
- [35] L.E. Vera-Avila, J.L. Gallegos-Perez, E. Camacho-Frias, Frontal analysis of aqueous phenol solutions in amberlite XAD-4 columns. Implications on the operation and design of solid phase extraction systems, Talanta. 50 (1999) 509-26.
- [36] H.M. Oliveira, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, V. Cerdà, Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants, Talanta. 77 (2009) 1466-1472.
- [37] M. Sinan Bilgili, Adsorption of 4-chlorophenol from aqueous solutions by xad-4 resin: isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis, J. Hazard. Mater. 137 (2006) 157-64.
- [38] V.. M. Gun'ko, V. V. Turov, V.I. Zarko, Y.M. Nychiporuk, E. V. Goncharuk, E.M. Pakhlov, et al., Structural features of polymer adsorbent LiChrolut EN and interfacial behavior of water and water/organic mixtures, J. Colloid Interface Sci. 323 (2008) 6-17.
- [39] J.N. Miller, J.C. Miller, Estadística y quimiometría para química analítica, 4a ed., Pearson Educación, Madrid, 2002.

Referencias

- [40] M.A. García, E. Soberón, M. Cortés, R. Rodríguez, J.L. Herrera, A. Alcántara, et al., Guía de validación de métodos analíticos, 1a ed., Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002.
- [41] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, TrAC - Trends Anal. Chem. 23 (2004) 535-552.
- [42] L. Huber, Validation of analytical methods, 1a ed., Agilent Technologies, Germany, 2010.
- [43] M.B. Ettinger, C.C. Kuchiioft, R.J. Lishka, Sensitive 4-aminoantipyrine method for phenolic compounds, Anal. Chem. 23 (1951) 1-6.
- [44] H. Gutiérrez Pulido, R. de la Vara Salazar, Análisis y diseño de experimentos, 2da ed., McGraw-Hill, México, D.F., 2008.
- [45] Degassing mobile phase solvents, (2015).
<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/s5/023.html> (accedido 3 de octubre de 2015).
- [46] Solvent mixing effects when making up eluents, (2015).
<http://www.laserchrom.com/LaserchromHPLC-HPLCTechnicalCentre-TechnicalTipe-SolventMixingProperties.htm> (accedido 3 de octubre de 2015).
- [47] G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, Quimiometría, 1a ed., Editorial Síntesis, Madrid, 2001.
- [48] NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos peligrosos se hace la clasificación CRETIB de los componentes de los residuos generados, 2005.

Anexo 1. Análisis de varianza [39]

En el trabajo analítico se suelen presentar comparaciones en las que intervienen más de dos medias. Algunas situaciones posibles de este tipo son: comparar la concentración media de proteína en disolución para muestras almacenadas en condiciones diferentes; comparar los resultados medios obtenidos de la concentración de un analito utilizando diferentes métodos analíticos y comparar la media de los resultados en una valoración obtenidos por diferentes operadores usando los mismos aparatos. En todos estos ejemplos hay dos posibles fuentes de variación. La primera, que siempre está presente, es debida al error aleatorio en la medida: este tipo de error provoca el que se obtenga un resultado diferente, cada vez que se repite una medida bajo las mismas condiciones. La segunda fuente de variación posible se debe a lo que se conoce como factor controlado o de efecto fijo. Para los ejemplos anteriores los factores de control son, respectivamente, las condiciones bajo las cuales se almacenó la disolución, el método de análisis empleado, y los operadores que realizaron la valoración.

El análisis de varianza (*ANOVA*, por sus siglas en inglés) es una técnica estadística muy potente que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación. Para los ejemplos concretos anteriores, se puede utilizar para separar la variación debida al error aleatorio de cualquier otra variación que venga provocada al cambiar el factor de control. De este modo se puede contrastar si una alteración del factor de control conduce a diferencias significativas entre los valores medios obtenidos.

El Cuadro 44 muestra los resultados obtenidos en una investigación sobre la estabilidad de un reactivo fluorescente bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Los valores proporcionados son las señales de fluorescencia (en unidades arbitrarias) de disoluciones diluidas de la misma concentración. Se tomaron tres medidas sobre cada muestra. El cuadro muestra que los valores medios de las cuatro muestras son diferentes. Sin embargo, se sabe que debido al error aleatorio, incluso si el valor verdadero que se quiere medir no ha variado, la media muestral puede variar de una muestra a otra. El método de análisis de varianza contrasta si la diferencia entre las medias muestrales es demasiado grande para explicarse mediante errores aleatorios.

La Figura 46 muestra un diagrama de puntos comparando los resultados obtenidos en diferentes condiciones. Esto sugiere que existe poca diferencia entre las condiciones A y B, si bien las condiciones de C y D difieren de las de A y B entre sí.

Cuadro 44. Fluorescencia de disoluciones almacenadas en diferentes condiciones

Condiciones	Medidas repetidas	Media
A: preparada recientemente	101, 100, 101	101
B: almacenada una hora en la oscuridad	101, 101, 104	102
C: almacenada una hora con luz tenue	97, 95, 99	97
D: almacenada una hora con luz brillante	90, 92, 94	92
	Media global	98

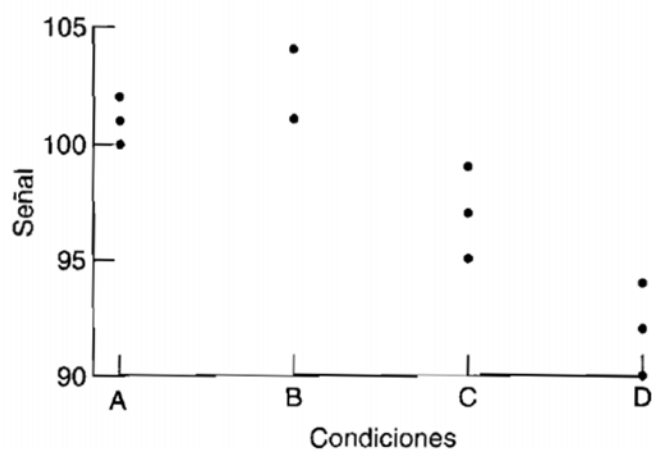


Figura 46. Diagrama de puntos de los resultados del Cuadro 44

El problema se puede generalizar al caso de considerar h muestras, cada una con n elementos, como se expone en el Cuadro 45 donde x_{ij} es la j -ésima medida de la i -ésima muestra. Las medias de las muestras son $\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_h$ y la media de todos los valores agrupados juntos es \bar{x} . La hipótesis nula adoptada es que todas las muestras se extraen de una población con media μ y varianza σ_0^2 . Bajo esta hipótesis, σ_0^2 se puede estimar de dos formas, una estudia la variación dentro de las muestras y la otra la variación entre muestras.

Cuadro 45. Generalización del Cuadro 44

							Media
Muestra 1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1j}	...	x_{1n}	\bar{x}_1
Muestra 2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2j}	...	x_{2n}	\bar{x}_2
...
Muestra i	x_{i1}	x_{i2}	...	x_{ij}	...	x_{in}	\bar{x}_i
...
Muestra h	x_{h1}	x_{h2}	...	x_{hj}	...	x_{hn}	\bar{x}_h
	Media global =						\bar{x}

1. *Variación dentro de muestras*

Para cada muestra se puede calcular una varianza utilizando la fórmula:

$$\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1) \tag{A-1}$$

Usando los valores del Cuadro 44 se tiene:

$$\text{Varianza de la muestra A} = \frac{(102 - 101)^2 + (100 - 101)^2 + (101 - 101)^2}{3 - 1} = 1$$

$$\text{Varianza de la muestra B} = \frac{(101 - 102)^2 + (101 - 102)^2 + (104 - 102)^2}{3 - 1} = 3$$

De manera similar se puede demostrar que las muestras C y D tienen ambas varianzas de 4.

Promediando estos valores resulta:

$$\text{Estimación dentro de muestras de } \sigma_0^2 = \frac{1 + 3 + 4 + 4}{4} = 3$$

Esta estimación tiene 8 grados de libertad, la estimación de cada muestra tiene 2 grados de libertad y hay 4 muestras, constatando el hecho de que esta estimación no depende de las medias de las muestras: por ejemplo, si todas las medias de la muestra A se incrementaran en 4 unidades, no variaría la estimación de σ_0^2 .

La fórmula general para la estimación de σ_0^2 dentro de muestras es:

$$\sigma_0^2 = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / h(n - 1) \tag{A-2}$$

La sumatoria sobre j y la división por $(n - 1)$ proporciona varianza de cada muestra; la sumatoria sobre i y la división por h promedia estas varianzas muestrales. La expresión de la ecuación A-2 se denomina un cuadrado medio (CM), puesto que conlleva una suma de términos cuadráticos (SC) dividida por el número de grados de libertad. Ya que en este caso el número de grados de libertad es 8 y el cuadrado medio es 3, la suma de los términos cuadráticos es $3 \times 8 = 24$.

2. *Variación entre muestras*

Si todas las muestras se extraen de una población cuya varianza es σ_0^2 , entonces sus medias proceden de una población con varianza σ_0^2/n . Así pues, si la hipótesis nula es verdadera, la varianza de las medias de las muestras proporciona una estimación de σ_0^2/n . Del Cuadro 44:

Varianza de la media muestral

$$= \frac{(101 - 98)^2 + (102 - 98)^2 + (97 - 98)^2 + (92 - 98)^2}{4 - 1} = \frac{62}{3}$$

De manera que la estimación de σ_0^2 es $\frac{62}{3} \times 3 = 62$. Esta estimación tiene 3 grados de libertad ya que se ha calculado a partir de cuatro medias muestrales. Nótese que esta estimación de σ_0^2 no depende de la variabilidad dentro de cada muestra, ya que se calcula a partir de media muestrales.

Sin embargo si, por ejemplo, la media de la muestra D cambiase, entonces esta estimación de σ_0^2 cambiaría.

En general se tiene:

$$\text{Estimación de } \sigma_0^2 \text{ entre muestras} = n \sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (h - 1) \quad (\text{A-3})$$

que al ser un “cuadrado medio” supone dividir una suma de términos cuadráticos entre el número de grados de libertad. En este caso el número de grados de libertad es 3 y el cuadrado medio 62, por lo que la suma de los términos cuadráticos es $3 \times 62 = 186$.

Resumiendo los cálculos realizados hasta aquí:

Cuadrado medio dentro de las muestras = 3 con 8 grados de libertad

Cuadrado medio entre las muestras = 62 con 3 grados de libertad

Si la hipótesis nula es correcta, estas dos estimaciones de σ_0^2 no deberían diferir significativamente. Si es incorrecta, la estimación entre muestras de σ_0^2 será mayor que la estimación dentro de las muestras debido a la variación entre muestras. Para contrastar si la estimación entre muestras es significativamente más grande se utiliza un contraste F de una cola (usualmente empleado para la comparación de varianzas).

$$F = \frac{62}{3} = 20.7$$

En tablas de valores críticos de F a una cola, muy comunes en libros de estadística, se obtiene el valor crítico de F es 4.006, a un nivel de significancia del 95% ($P = 0.05$). Puesto que el valor calculado de F es mayor que éste, se rechaza la hipótesis nula: las medias muestrales difieren significativamente.

Actualmente, hay muchos paquetes de software capaces de hacer los cálculos del análisis de varianza. Generalmente, estos dan un cuadro donde se resumen los

resultados y de los cuales se puede extraer información importante para determinar si hay diferencias significativas o no. En el Cuadro 46 se presenta un ejemplo.

Cuadro 46. Ejemplo de cuadro de análisis de varianza generado por el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad (Gl)	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre muestras	$n \sum_i (x_i - \bar{x})^2$	$h - 1$	$n \sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (h - 1)$	$\frac{CM_{entre\ muestras}}{CM_{dentro\ de\ muestras}}$	
Dentro de muestras	$\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$h(n - 1)$	$\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / h(n - 1)$		
Total	$\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x})^2$	$hn - 1$			

Se observa que el software, de manera adicional, genera un valor-P. El valor-P es el área bajo la distribución estadística de referencia más allá del valor del estadístico de prueba. De lo anterior se desprende que se rechaza la hipótesis nula si la significancia observada es menor que la significancia dada, o sea, si el $valor - P > \alpha$.

En este anexo se han establecido ciertos supuestos al realizar los cálculos del análisis de varianza. El primero consiste en que la varianza del error aleatorio no está afectada por el tratamiento utilizado. Este supuesto está implícito en la combinación de varianzas dentro de muestras para calcular una estimación global de la varianza del error. Al hacer esto, se está suponiendo lo que se conoce como homogeneidad de la varianza.

Un segundo supuesto consiste en que la variación incontrolada es aleatoria. Éste no sería el caso si, por ejemplo, existiera algún factor incontrolado tal como un cambio en la temperatura, que produjese una tendencia en los resultados a lo largo de un período de tiempo. El efecto de tales factores incontrolados puede superarse en gran medida mediante técnicas de aleatorización y de bloques.

Como se vio en este anexo, el análisis de varianza es una poderosa herramienta en el análisis estadístico y en la química analítica. Entre sus múltiples aplicaciones se encuentran la determinación de la linealidad de una recta de regresión lineal, el estudio de factores significativos en diseños experimentales y cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad de un método analítico.

Anexo 2. Rectas de regresión ponderadas [39]

En algunos casos de regresión lineal, los errores son aproximadamente proporcionales a la concentración de analito (es decir, el error relativo será aproximadamente constante) y, en algunos más, el error en la dirección de y aumentará cuando aumenta x , pero con menos rapidez que la concentración. Ambos tipos de datos heterocedásticos deberían ser tratados mediante métodos de regresión ponderados. Los cálculos de regresión ponderados son bastante más complejos que los no ponderados y requieren más información (o el uso de más supuestos). No obstante, deberían utilizarse cuando se sospecha heterocedasticidad.

En la Figura 47 se muestra la situación que surge cuando el error en un cálculo de regresión es aproximadamente proporcional a la concentración de analito, es decir, las "barras de error" utilizadas para expresar los errores aleatorios en los diferentes puntos de calibrado se alargan a medida que aumenta la concentración.

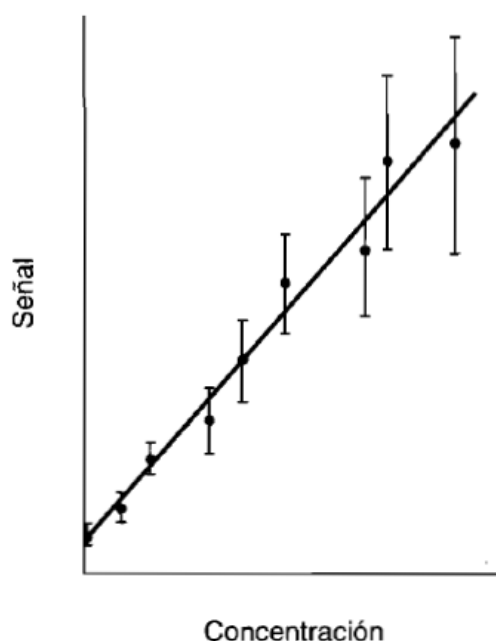


Figura 47. La ponderación de errores en un cálculo de regresión [39]

La recta de regresión debe ser calculada para proporcionar una ponderación adicional a aquellos puntos donde las barras de error son más cortas: es más importante para la recta calculada pasar cerca de tales puntos que pasar cerca de los puntos que representan concentraciones más altas con errores más grandes. Este resultado se logra dando a cada punto una ponderación inversamente proporcional a la varianza correspondiente, s_i^{-2} . Así

Anexo 2

pues, los puntos individuales son denotados como $(x_1, y_1), (x_2, y_2),$ etc., como es habitual, y las correspondientes desviaciones estándar son $s_1, s_2,$ etc., entonces las ponderaciones individuales, $w_1, w_2,$ etc., vienen dadas por:

$$\text{Ponderaciones: } w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} \quad (\text{A-4})$$

La pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión vienen dadas por:

$$\text{Pendiente ponderada: } b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (\text{A-5})$$

y por:

$$\text{Ordenada en el origen ponderada: } a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w \quad (\text{A-6})$$

En la ecuación anterior, \bar{y}_w y \bar{x}_w representan las coordenadas del centro de gravedad ponderado, por el que debe pasar la recta de regresión ponderada. Como se esperaba, estas coordenadas vienen dadas por $\bar{x}_w = \sum_i w_i x_i / n$ y $\bar{y}_w = \sum_i w_i y_i / n$.

El centro de gravedad ponderado está mucho más cerca del origen del gráfico que el centro de gravedad no ponderado y la ponderación dada a los puntos más próximos al origen asegura que la recta de regresión ponderada tiene una ordenada en el origen muy cercana a este punto.

Para calcular las incertidumbres de los parámetros del modelo ponderado, primero hay que calcular las varianzas de los residuos

$$s_{(y/x)w}^2 = \frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \quad (\text{A-7})$$

Este valor se utiliza en el cálculo de las varianzas de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta de regresión ponderada:

$$\text{Varianza de la ordenada: } s_{0,w}^2 = s_{e,w}^2 \frac{\sum_i w_i x_i^2}{\sum_i w_i (\sum_i w_i x_i^2 - \sum_i w_i \bar{x}_w^2)} \quad (\text{A-8})$$

y por:

$$\text{Ordenada en el origen ponderada: } s_{1,w}^2 = s_{e,w}^2 \frac{s_{e,w}^2}{\sum_i w_i x_i^2 - \sum_i w_i \bar{x}_w^2} \quad (\text{A-9})$$

Y finalmente, la varianza de las predicciones de x viene dada por:

$$s_{x_{0w}} = \frac{s_{(y/x)w}}{b_w} \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b_w^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \right\}^{1/2} \quad (\text{A-10})$$

donde w_0 es una ponderación adecuada del valor de y_0 . Los límites de confianza de la pendiente y el intercepto se calculan del mismo modo que para la recta no ponderada.

Como se ha visto, los cálculos son muy tediosos; sin embargo, actualmente se cuenta con algunos programas estadísticos capaces de procesar datos de regresiones ponderadas. Un ejemplo de esto es el software Minitab 17. La ventaja de este software es que puede calcular la recta de regresión ponderada, sus parámetros con sus respectivos errores y el análisis de varianza de la regresión para confirmar que se trata de una regresión lineal.

A continuación se presenta un ejemplo de recta de regresión ponderada (Cuadro 47), la cual es la misma que la mostrada para fenol el día 1 en el apartado 5.3.2 Determinación de fenol por FIA con el eluyente modificado.

Cuadro 47. Curva de calibración para fenol en eluyente

x_i	y_i	w_i	FITS1
0.5	0.01909	6.51040247	0.03280882
5	0.12294	0.03570072	0.12388757
10	0.23246667	0.13062429	0.22508617
15	0.33308	0.21627251	0.32628478
20	0.44239333	0.09564408	0.42748339
25	0.53463333	0.00485834	0.528682
30	0.60951	0.00649759	0.62988061

Con ayuda de la regresión lineal ajustada del Minitab 17 se generó el análisis de varianza, el coeficiente de regresión de la recta ponderada, los coeficientes de la regresión con su correspondiente error y la ecuación de regresión ponderada. La recta de regresión ponderada se muestra en la Figura 48.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	0.295793	0.295793	1306.08	0.000
xi	1	0.295793	0.295793	1306.08	0.000
Error	4	0.000906	0.000226		
Total	5	0.296699			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0150491	99.69%	99.62%	98.87%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.0112	0.0122	0.91	0.412	
xi	0.022843	0.000632	36.14	0.000	1.00

Regression Equation

$$y_i = 0.0112 + 0.022843 x_i$$

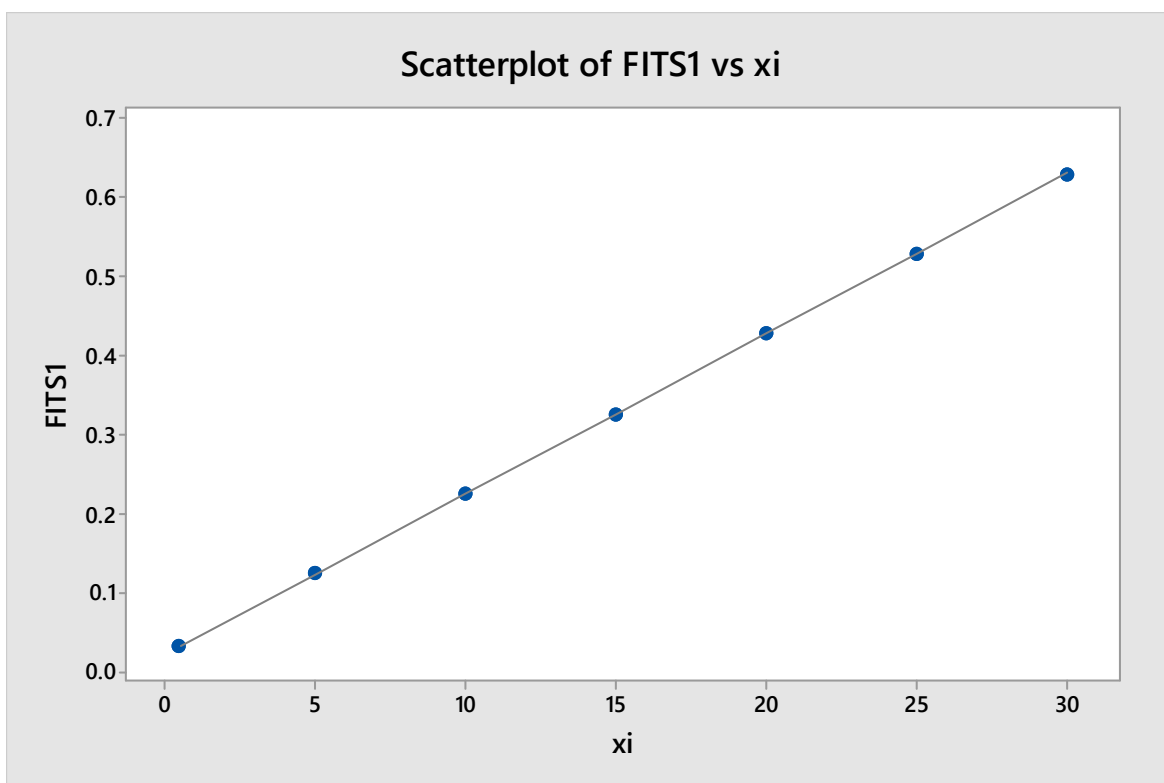


Figura 48. Recta de regresión ponderada para fenol 0.5-30 mg/L.

Anexo 3. Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación

En esta investigación se generaron residuos que representan un peligro para el ambiente. Para ver en qué parte del proceso analítico fueron generados, puede remitirse a las Figuras 13 y 14 de este documento. Así, se pueden distinguir dos corrientes de desechos: los desechos provenientes de la preconcentración y los generados por el *FIA*.

Los compuestos presentes en los residuos generados a partir de esta investigación se enumeran a continuación (ordenados en forma descendente de acuerdo a su concentración aproximada):

- Disolución amortiguadora amoniacal 0.3 M a valor de pH 9
- $K_3[Fe(CN)_6]$
- 4-AAP
- Compuestos fenólicos: fenol, 2-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol
- MeOH 20% v/v
- NaOH 0.1 M
- HCl 0.01 M

De acuerdo con la NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos peligrosos [48] se hace la clasificación CRETIB de los componentes de los residuos generados.

Cuadro 48. Residuos generados en este trabajo

Compuesto	CRETIB
NH_4^+/NH_3	No aparece en el listado
$K_3[Fe(CN)_6]$	Reactivo
Fenoles	Tóxico
MeOH	Inflamable
NaOH	Corrosivo
HCl	Corrosivo

Debido a la presencia del $K_3[Fe(CN)_6]$, los residuos debían mantenerse a pH alcalino, a fin de evitar la producción de ácido cianhídrico, el cual es altamente tóxico. Para evitar la generación del ácido cianhídrico, los residuos generados de la preconcentración se neutralizaban con NaOH 0.1 M previo a su mezcla con los demás residuos. Luego, se procedía a almacenarlos en recipientes de polipropileno de alta densidad con capacidad de 20 L. Posteriormente, en las fechas indicadas por la Unidad de Gestión Ambiental de la

Anexo 3

Facultad de Química de la UNAM se mandaba la lista de residuos peligrosos, y posteriormente se entregaban para su desactivación.