

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUIMICA**



**“DETERMINACIÓN DE FENOLES EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE  
LÍQUIDOS CON PRECONCENTRACIÓN EN FASE SÓLIDA”**

Tutores:

Dra. Nereida Carrión

Dr. Andrés Escalona

Trabajo Especial de Grado presentado  
ante la ilustre Universidad Central de  
Venezuela por el Br. Cesar Español para  
optar al Título de Licenciado en Química

Caracas, mayo de 2009

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUIMICA**



**“DETERMINACIÓN DE FENOLES EN AGUA POR CROMATOGRFÍA DE  
LÍQUIDOS CON PRECONCENTRACIÓN EN FASE SÓLIDA”**

Tutores:

Dra. Nereida Carrión

Dr. Andrés Escalona

Trabajo Especial de Grado presentado  
ante la ilustre Universidad Central de  
Venezuela por el Br. Cesar Español para  
optar al Título de Licenciado en Química

Caracas, mayo de 2009

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "Determinación de fenoles en agua por cromatografía de líquidos con preconcentración en fase sólida". Presentado por el Br. Cesar Español, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



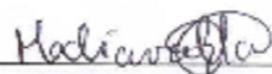
Profa. Nereida Carrión  
(Tutora)



Prof. Andrés Escalona  
(Tutor)



Profa. Rosa Amaro  
(Jurado)



Profa. Marta Mediavilla  
(Jurado)

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUIMICA

“DETERMINACIÓN DE FENOLES EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS  
CON PRECONCENTRACIÓN EN FASE SÓLIDA”

Trabajo Especial de Grado, para optar al Título de Licenciado en Química.

Autor: Cesar Español  
Tutores: Dra. Nereida Carrión  
Dr. Andrés Escalona

### RESUMEN

En el desarrollo del estudio de los fenoles considerados por la EPA como contaminantes de remoción prioritaria en los cuerpos acuosos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) se determinaron las condiciones óptimas para la separación, determinación y cuantificación de estos compuestos los cuales son elevadamente tóxicos. Adicionalmente se calcularon las figuras de mérito para la separación cromatográfica obteniendo resultados que permiten utilizar el método cromatográfico como una alternativa para la regulación de líquidos que sean o vayan a ser descargados en forma directa o indirecta a ríos, estuarios, lagos y embalses; y de esta forma realizar controles ambientales.

Se realizaron estudios de la capacidad de adsorción por alúminas modificadas con surfactantes de estos fenoles utilizando este sólido como material adsorbente en la extracción en fase sólida.

La alúmina modificada fue evaluada con dos procedimientos para la adsorción según el volumen de solución a utilizar encontrándose diferencias significativas entre ambos procedimientos. En el primer procedimiento se utilizaron jeringas para hacer pasar las soluciones por medio de presión positiva por el cartucho y en el segundo procedimiento se utilizó una bomba peristáltica para este fin; siendo este último procedimiento con el

que se obtienen los resultados mas bajos de recuperación (11%) comparados con las recuperaciones cercana al 100% encontradas en el primer procedimiento.

Al no obtener los resultados esperados en las experiencias de preconcentración se recomienda estudiar con mayor profundidad el segundo procedimiento con el fin de encontrar las condiciones de flujo que permitan una mayor adsorción y recuperación de los fenoles por el sólido utilizado; y de esta forma encontrar las causas de la diferencia entre los resultados de ambos procedimientos utilizados en esta investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme dado las fuerzas, el valor y el deseo que me permitieron perseverar para poder realizar este trabajo y culminarlo.

A mi madre por enseñarme que la perseverancia es el camino para alcanzar todas aquellas cosas que deseamos conseguir, gracias por todo lo que me has enseñado.

A mi padre Andrés Adames por ser un ejemplo y mi gran apoyo durante toda mi vida.

A mi familia; la familia Adames, por enseñarme que nunca se esta solo en este mundo y que siempre se puede contar con ellos sin importar el desafío que se presente.

A la mujer de mi vida. Ariana Otaiza, por ser parte activa durante toda mi carrera universitaria, por estar siempre a mi lado dándome fuerzas y alentándome a continuar y a conseguir mis metas. TE AMO.

Al profesor Andrés Escalona, por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela durante el desarrollo de este trabajo y estar presente cada vez que necesitaba su orientación y su apoyo.

A la profesora Nereida Carrión, por su constancia, por su apoyo y su orientación, ya que sin su dedicación no hubiese podido llevar a cabo este trabajo.

Al profesor Gustavo Pérez, por nunca tener un no como respuesta cada vez que necesité de su ayuda, su experiencia y su orientación durante el desarrollo de la parte experimental de la investigación.

A la profesora Rosa Amaro, por sus recomendaciones y su orientación durante el desarrollo de la investigación.

A mis amigos, Yves, Jacobo y Miguel por apoyarme durante toda la carrera y con quienes compartí muchísimas experiencias tanto dentro como fuera de las aulas.

A mis compañeros del CQA, David, Juan Pablo, Katy, Dilia por siempre estar dispuestos a tenderme su mano y ayudarme en todo lo que fuese necesario para llevar a cabo esta investigación.

A toda aquellas personas que creyeron en mi y que de una u otra forma contribuyeron a mi formación y desarrollo como persona y como profesional.

¡GRACIAS A TODOS!

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Procedimientos utilizados en la actualidad en el tratamiento y purificación de aguas para el consumo humano	4
2.1.1. Métodos de tratamiento físico	4
2.1.2. Métodos de tratamiento biológico	6
2.1.3. Métodos de tratamiento químico	8
2.1.4. Otros procedimientos utilizados para la potabilización del agua	9
2.2. Procedimientos establecidos para el tratamiento de fenoles	10
2.2.1 Extracción	11
2.2.2. Adsorción	11
2.2.3. Intercambio iónico	12
2.2.4. Tratamiento electroquímico	12
2.2.5. Oligomerización enzimática	13
2.2.6. Biodegradación	13
2.2.7. Incineración	14
2.2.8. Oxidación con agua supercrítica	14
2.2.9. Degradación de contaminantes por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	14
2.2.10. Degradación de contaminantes por O <sub>3</sub> /UV	15
2.2.11. Degradación de contaminantes por TiO <sub>2</sub> /UV	15
2.2.12. Degradación de contaminantes por sonoquímica	15
2.3. Fenol	16
2.4. Cromatografía	20

2.4.1. Tipos de separaciones Cromatográficas	24
2.5. Cromatografía en Columna	25
2.6. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC)	27
2.6.1. Cromatografía de Reparto	28
2.6.2. Instrumentación	29
2.7. Extracción en Fase Sólida	35
2.7.1 Métodos de operación en SPE	36
2.8. Alúminas	37
2.8.1. Tipos de Alúminas	38
2.9. Antecedentes	39
3. OBJETIVOS	44
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	45
4.1. Determinación de los 11 fenoles EPA por HPLC	45
4.1.1. Reactivos	45
4.1.2. Instrumentación	46
4.2. Determinación de las figuras de mérito	51
4.3. Modificación de la alúmina	52
4.3.1. Reactivos	52
4.3.2. Materiales	52
4.4. Determinación de la adsorción de los fenoles por la alúmina modificada mediante SPE	53
4.4.1. Extracción en Fase sólida	53
4.4.1.1. Reactivos	53
4.4.1.2. Materiales	53

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
5.1. Optimización de la separación cromatográfica de los fenoles considerados contaminantes de remoción prioritaria por la EPA	57
5.2. Determinación de las figuras de mérito para la separación cromatográfica propuesta	66
5.3. Estudio de un procedimiento de preconcentración de los fenoles considerados contaminantes de remoción prioritaria por la EPA	68
5.3.1. Modificación de alúmina con dodecilsulfato de sodio	69
5.3.2. Extracción en Fase Sólida	69
5.3.2.1. Estudio de la adsorción y desorción del fenol; 2,4-diclorofenol (DCP); 2,4,6-triclorofenol (TCP) y pentaclorofenol (PCP) por la alúmina modificada	70
5.3.2.2. Adsorción del fenol en el cartucho de SPE	76
5.3.2.3. Evaluación del volumen ideal de desorción	78
5.3.2.4. Influencia del pH en la adsorción	81
5.3.2.5. Evaluación de la adsorción y desorción de 4-nitrofenol (4-NP); 2,4- dinitrofenol (2,4-DNP); 2-nitrofenol (2-NP) y 2,4-dimetilfenol (2-DMP)	84
5.3.2.6. Estudio de la adsorción y desorción de los 8 patrones Ph; 4-NP; 2,4-DNP; 2-NP; 2,4-DMP; 2,4-DCP; 2,4,6-TCP; PCP	87
5.3.2.7. Pruebas de preconcentración de fenoles	94
6. CONCLUSIONES	98

7. RECOMENDACIONES	99
8. BIBLIOGRAFÍA	100
9. ANEXOS	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Cromatograma detección vs tiempo de retención	21
<b>Figura 2.</b> Cromatografía en columna y detección de 2 analitos	26
<b>Figura 3.</b> Bomba recíproca	31
<b>Figura 4.</b> Sistema de inyección	31
<b>Figura 5.</b> Columna para HPLC	32
<b>Figura 6.</b> Detector de absorbancia UV/VIS	34
<b>Figura 7.</b> Desgasificador HP serie 1100	46
<b>Figura 8.</b> Bomba cuaternaria HP serie 1100	47
<b>Figura 9.</b> Automuestreador HP serie 1100	47
<b>Figura 10.</b> Sección de la columna HP serie 1100	48
<b>Figura 11.</b> Detector UV/VIS HP serie 1100	48
<b>Figura 12.</b> Columna supelco modelo supelcosil LC – 8- DB	49
<b>Figura 13.</b> Vista del software Chem – Station durante una corrida	49
<b>Figura 14.</b> Jeringas comerciales para la inyección de insulina	54
<b>Figura 15.</b> Materiales para la construcción del cartucho de SPE	54
<b>Figura 16.</b> Cartucho preparado en el laboratorio para realizar SPE	55
<b>Figura 17.</b> Cartucho de SPE con jeringa para pruebas preliminares de absorción de la alúmina	55
<b>Figura 18.</b> Bomba peristáltica marca Gilson modelo miniplus 3 utilizada para la SPE	56
<b>Figura 19.</b> Cromatograma de la primera corrida de los patrones detectados a 254 y 278	57
<b>Figura 20.</b> Cromatograma que muestra la separación de los fenoles con el gradiente mostrado en la tabla 3. Detectados a 254 y 280 nm	59

<b>Figura 21.</b> Disminución de los $t_R$ al aumentar el flujo de fase móvil	60
<b>Figura 22.</b> Cromatograma e el que se observan 2 picos a las nuevas $\lambda$ de detección	61
<b>Figura 23.</b> Cromatograma en el que se observan los compuestos a las $\lambda$ óptimas de detección	62
<b>Figura 24.</b> Separación de los fenoles con aumento de la relación de metanol en el gradiente a tiempos menores	63
<b>Figura 25.</b> Cromatograma con las condiciones óptimas de separación	65

## ÍNDICE GRÁFICOS

		Pág.
<b>Grafico 1.</b>	Masa recuperada vs. Volumen de desorción	72
<b>Grafico 2.</b>	Masa recuperada vs. Volumen añadido	74
<b>Grafico 3.</b>	Solución inicial y masa medidas después de pasar la solución por el cartucho	75
<b>Grafico 4.</b>	Masa recuperada en las desorciones y sumatoria de la masa recuperada	76
<b>Grafico 5.</b>	Masa inicial de fenol y masa medida después del cartucho	77
<b>Grafico 6.</b>	Masa adsorbida en el cartucho de 0,4g de masa de adsorbente	79
<b>Grafico 7.</b>	Masa recuperada en las desorciones sucesivas	80
<b>Grafico 8.</b>	Comparación adsorción - desorción	81
<b>Grafico 9.</b>	Adsorción de los patrones a pH ácido	82
<b>Grafico 10.</b>	Evaluación de la masa recuperada a medida que aumentan las desorciones	83
<b>Grafico 11.</b>	Comparación de la masa adsorbida y la masa total recuperada	84
<b>Grafico 12.</b>	Comparación de la masa inicial y la masa final medida después del cartucho	85
<b>Grafico 13.</b>	Evaluación de la masa recuperada a medida que aumentan las desorciones	86
<b>Grafico 14.</b>	Masa adsorbida vs. masa total recuperada	87
<b>Grafico 15.</b>	Comparación de la masa inicial de los patrones en solución vs la masa medida después del cartucho	88
<b>Grafico 16.</b>	Masas recuperadas en los diferentes lavados y totales de masas recuperadas en cada lavado.	89
<b>Grafico 17.</b>	Comparación de la adsorción y el total recuperado	90

	de los patrones individuales y la suma de los mismos	
<b>Grafico 18.</b>	Comparación de la masa inicial en solución y la masa final medida después del cartucho	91
<b>Grafico 19.</b>	Desorción de los 8 patrones con 5 lavados de 0,25 mL de metanol	92
<b>Grafico 20.</b>	Comparación de la adsorción y el total recuperado	93
<b>Grafico 21.</b>	Flujo de solución en el cartucho vs. Masa de Ph recuperada con los lavados	95
<b>Grafico 22.</b>	Flujo de solución en el cartucho vs. Masa de PCP recuperada con los lavados	96

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de los métodos de cromatografía en columna	25
<b>Tabla 2.</b>	Datos de investigaciones anteriores utilizados en la optimización de la separación	50
<b>Tabla 3.</b>	Gradiente de 50 minutos utilizado para la separación de fenoles	58
<b>Tabla 4.</b>	Gradiente a 1mL/min tiempo de parada 37 min	60
<b>Tabla 5.</b>	Gradiente con las $\lambda$ óptimas de detección	62
<b>Tabla 6.</b>	Aumento de relación de metanol a tiempos inferiores	63
<b>Tabla 7.</b>	Gradiente de separación óptima de los 11 fenoles	64
<b>Tabla 8.</b>	Figuras de merito	66
<b>Tabla 9.</b>	Titulación del SDS por el método de azul de metileno	69
<b>Tabla 10.</b>	Adsorción del Ph, DCP, TCP y PCP	70
<b>Tabla 11.</b>	Evaluación de la desorción de Ph, DCP, TCP, PCP con diferentes volúmenes de desorción	71
<b>Tabla 12.</b>	Adsorción de Ph, DCP, TCP, PCP solución de partida 4ppm	72
<b>Tabla 13.</b>	Recuperación de los contaminantes con diferentes volúmenes de desorción	73
<b>Tabla 14.</b>	Reproducibilidad de la adsorción	74
<b>Tabla 15.</b>	Reproducibilidad de la desorción	75
<b>Tabla 16.</b>	Adsorción de los fenoles en el cartucho de 0,4g de masa de adsorbente	78
<b>Tabla 17.</b>	Masas recuperadas en las diferentes desorciones	79
<b>Tabla 18.</b>	Comparación adsorción - total recuperado	80
<b>Tabla 19.</b>	Evaluación de la adsorción con pH ácido	82
<b>Tabla 20.</b>	Evaluación de la desorción	82

<b>Tabla 21.</b>	Comparación masa adsorbida masa total recuperada	83
<b>Tabla 22.</b>	Adsorción de los 4 patrones evaluados en esta experiencia	85
<b>Tabla 23.</b>	Evaluación de la desorción de los patrones en el cartucho	86
<b>Tabla 24.</b>	Masa absorbida vs masa total recuperada	87
<b>Tabla 25.</b>	Adsorción de los 8 patrones en el cartucho	88
<b>Tabla 26.</b>	Desorción de los 8 patrones con las diferentes desorciones del cartucho	89
<b>Tabla 27.</b>	Comparación de la adsorción y total recuperado en las desorciones	90
<b>Tabla 28.</b>	Adsorción de los 8 patrones en el cartucho 0,4g de alúmina	91
<b>Tabla 29.</b>	Evaluación de la desorción con 5 lavados de 0,25 mL de metanol	92
<b>Tabla 30.</b>	Comparación de la adsorción y la recuperación total	93
<b>Tabla 31.</b>	Evaluación de la velocidad de adsorción y la masa de fenol recuperada	95
<b>Tabla 32.</b>	Evaluación de la velocidad de adsorción y la masa de pentaclorofenol recuperada	96

## 1. INTRODUCCIÓN

Las actividades industriales realizadas por el hombre en la búsqueda del desarrollo continuo, generan una serie de contaminantes los cuales muchas veces son vertidos en los efluentes acuáticos (mares, ríos o lagos) sin un tratamiento previo que convierta estas sustancias en compuestos que no representen un riesgo para los ecosistemas que los rodean. Es por ello que existe una preocupación creciente en las personas y organizaciones relacionadas con el medio ambiente y estos ecosistemas debido al deterioro progresivo del ambiente causado por la gran cantidad de desechos industriales vertidos en las aguas. Este deterioro ambiental es el resultado de la búsqueda de mejoras en la calidad de vida del hombre, el cual hace uso indiscriminado de los recursos que provee la naturaleza y en su afán de progreso causa un impacto negativo en todos los ecosistemas que se relacionan con su entorno.

En la actualidad existe una preocupación creciente debido a la contaminación de los cuerpos acuáticos causada por la gran cantidad de desechos que son vertidos en los diferentes efluentes ya sea producto de procesos industriales o por actividades de la vida diaria de los seres humanos; quienes en su afán de mejorar su calidad de vida, en la búsqueda de su desarrollo constante, causa un impacto negativo en los ecosistemas que rodean tanto los centros urbanos como los centros industriales, ya que muchas de las sustancias que son vertidas en los efluentes acuáticos sin un tratamiento previo, son compuestos que poseen una alta peligrosidad, producto de su toxicidad. Es por esto que en los últimos años han aumentado los controles en las legislaciones de muchos países con el fin de atacar este problema que de no ser atendido con prontitud pudiese desencadenar una crisis mundial, ya que, aunque el agua es un producto natural renovable los niveles de contaminación aunados al calentamiento global y a las pérdidas de reservas acuáticas en muchas regiones podrían dejar al planeta sin la disponibilidad de el denominado “vital líquido”

Actualmente se habla de el fenol y los fenoles sustituidos como contaminantes de gran importancia en las aguas debido a su amplio uso en los procesos industriales, tales como la producción de fertilizantes, removedores de pinturas, caucho, preservantes de madera, resinas sintéticas, textiles, medicamentos, desinfectantes, en la industria del papel, la industria petrolera, la producción agrícola, entre otros. Los fenoles poseen una alta toxicidad y confieren olores desagradables a las aguas. Debido a esto algunos fenoles están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Unión Europea (UE), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y en las legislaciones de muchos países [1,2]

Dado el uso de los compuestos fenólicos es posible encontrar concentraciones apreciables en las aguas residuales no solo de las industrias sino en las redes cloacales que recogen las aguas de uso domestico, esto sumado a la resistencia que presentan estos compuestos a los tratamientos que se le dan comúnmente a estas aguas hacen necesaria la creación de procedimientos alternos que permitan su remoción, ya que son considerados altamente peligrosos tanto para el ambiente como para los seres humanos debido a su alta toxicidad a pequeñas concentraciones (mg/L).

En las regulaciones internacionales (EPA y UE) los límites máximos permitidos para los fenoles son  $1\mu\text{g/L}$  y  $5\mu\text{g/L}$  para los fenoles individuales y totales respectivamente en aguas que se utilizan para el consumo humano. En las normas venezolanas los límites máximos permitidos son  $2\mu\text{g/L}$  para fenoles totales en los cuerpos acuáticos que pueden ser utilizados para el consumo humano y  $0,5\text{ mg/l}$  para la descarga de contaminantes a dichos cuerpos. Esto debido a que dichos compuestos son tóxicos para los organismos acuáticos que pueden llegar a ser fuentes de contaminación para los seres humanos que consuman alimentos contaminados [3,4]

La importancia que poseen los compuestos fenólicos como contaminantes de los alimentos se debe a que estos no son degradados por el sistema digestivo, por lo que

causan una intoxicación y hasta la muerte debido al proceso de bioacumulación, que no es más que la acumulación de sustancias tóxicas en los seres vivos a medida que se asciende en la cadena trófica. Una vez en el organismo pueden afectar diferentes órganos como el hígado, los riñones, los pulmones y el sistema nervioso central por lo que dependiendo del grado de intoxicación y del órgano afectado pueden ser confundidas con diferentes enfermedades hasta determinarse que el malestar sea producto de una intoxicación por consumo de fenoles.

Es por ello que en los últimos años las investigaciones científicas relacionadas con el impacto negativo del hombre en el medio ambiente tienen como uno de sus puntos focales desarrollar técnicas y procedimientos alternativos que permitan determinar y cuantificar la presencia de estos contaminantes específicos con eficacia cada vez superior en contraposición con los compromisos económicos para lograr procesos óptimos de remoción de contaminantes sin elevar de manera significativa los costos de los tratamientos empleados para purificar las aguas.

En la presente investigación se emplea la HPLC como método analítico para la determinación de fenoles en muestras acuosas con la finalidad de evaluar, el grado de contaminación de estas aguas y desarrollar un método de control ambiental aplicable a los diferentes efluentes acuáticos, así como a las zonas en las cuales se descargan dichos contaminantes en estos efluentes

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la siguiente revisión bibliográfica se desarrollaran los conceptos relacionados a las técnicas que se emplearan en la investigación así como también los antecedentes y la justificación del presente trabajo de investigación. Entre los temas relacionados se encuentran los distintos procedimientos para el tratamiento y la purificación de aguas, los conceptos básicos de la cromatografía y la cromatografía de líquidos de alta eficacia. También se hará una breve descripción de los trabajos realizados en este tema con anterioridad y finalmente se presentara la justificación de la investigación.

El fundamento de esta investigación es la creación de un procedimiento analítico para la separación y determinación del fenol y los fenoles sustituidos en efluentes acuáticos contaminados.

### 2.1. Procedimientos utilizados en la actualidad en el tratamiento y purificación de aguas para el consumo humano

De acuerdo a la naturaleza del tratamiento empleado los tratamientos y purificación del agua se pueden clasificar en: tratamiento físico, biológico y químico.

#### 2.1.1. Métodos de tratamiento físico

Se basa en una separación mecánica o por acción de la gravedad de materiales sólidos suspendidos.

➤ *Tratamiento térmico:* la ebullición es una manera de purificar el agua de todos los agentes patógenos. Muchos expertos indican que el agua es segura si alcanza el punto de ebullición y se mantiene a esa temperatura durante unos minutos, de cinco a 10 minutos, esto con la finalidad de desactivar las esporas

bacterianas que podrían sobrevivir a la ebullición. El tratamiento térmico no aporta agentes residuales (desinfectantes) que ayuden a mantener el agua libre de agentes patógenos en almacenamiento.

➤ *Osmosis inversa:* la osmosis inversa implica el flujo de agua bajo presión a través de una membrana que es impermeable a muchos contaminantes entre los que se destacan sales de ácidos débiles, bases, ácidos orgánicos débiles, aminas, fenoles, algunos pesticidas, grandes moléculas orgánicas y todos los agentes patógenos son rechazados. El agua producto de esta técnica es cercana al agua pura, pero imperfecciones en la membrana pueden dar paso a muchos contaminantes e incluso agentes patógenos enteros. La osmosis inversa tiene como desventaja la utilización de grandes cantidades de agua, cerca del 75% del agua tratada es desechada con los contaminantes.

➤ *Destilación:* la destilación es la evaporación y condensación del agua para su purificación, se utiliza frecuentemente para remover sales y minerales disueltos en el agua. La destilación tiene dos grandes desventajas, la primera es el gran consumo de energía ya que requiere una fuente de calor para hervir el agua que luego será condensada y la segunda, es la condensación de contaminantes con puntos de ebullición menores al agua si se utiliza la destilación simple.

➤ *Microfiltro:* Los microfiltros son diseñados en pequeñas escalas para remover quistes, sólidos suspendidos y bacterias del agua, la mayoría de ellos usan un elemento de fibra o cerámica que puede ser regenerado para restablecer el desempeño de las unidades estos dispositivos son hechos para campamentos y utilizan una bomba manual para proveer la energía a la corriente del agua que pasará a través del filtro. Los microfiltros son capaces de remover bacilos pero no retienen virus, algunos sistemas utilizan filtros previos de carbón activado y resinas de yodo con la finalidad de remover los virus y extender la vida útil del filtro principal.

➤ *Filtros de arena fina:* estos dispositivos hacen fluir el agua a través de un lecho de arena que tiene como función remover agentes patógenos y la turbidez.

Típicamente el filtro constará de un estrato de arena y luego un estrato de la grava que esta incrustada en el caño del drenaje, la grava no toca las paredes del filtro con la finalidad de evitar cortocircuitos que disminuyan el contacto agua – arena y por lo tanto la efectividad del tratamiento. Los filtros de arena pueden ser limpiados muchas veces antes de reemplazar la arena y solo pueden ser utilizados de manera continua debido a que presentarían inconvenientes de turbidez de ser utilizados en cargas. Estos dispositivos pueden ser limpiados con una corriente de agua limpia.

➤ *Filtros de carbón activados:* el filtro de carbón funciona por el mismo principio que el filtro de arena, la diferencia radica en los elementos filtrantes y su finalidad. El carbón activado es un material natural que por millones de agujeros microscópicos que atrae, captura y rompe las moléculas de los contaminantes presentes. Su principal función radica en utilización para eliminar o despejar olores y sabores desagradables, compuestos orgánicos y residuos de cloro. La adsorción por carbón activado es una tecnología muy usada en la industria del tratamiento de agua potable y esta incrementando su frecuencia de usos en el tratamiento de aguas de desechos industriales, la principal ventaja de este proceso es la gran capacidad adsorptiva del carbón activado donde muchas moléculas orgánicas son adsorbidas. Aunque el carbón puede ser regenerado, en la práctica el carbón es frecuentemente desechado, especialmente si contiene altas concentraciones de bencenos policlorados. [5]

### **2.1.2. Métodos de tratamiento biológico**

En el tratamiento biológico se aprovecha la actividad microbiana para remover las bacteria orgánicas, esto debido principalmente a la acción de bacterias del tipo saprobias o saprofitas las cuales pueden ser del tipo aerobias (actúan en presencia de

oxígeno), anaerobias (actúan en ausencia de oxígeno) o también del tipo anaerobias del tipo facultativas, es decir, que actúan en presencia o ausencia de oxígeno. [6]

Los sistemas biológicos aeróbicos son diseñados para remover materia orgánica biodegradable, medida en termino de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y no toman en cuenta la reactividad química de los diferentes compuestos o especies altamente refractaria. La oxidación de la materia orgánica provee nutrientes tales como fosfatos y nitrógeno que les permiten a los organismos realizar procesos metabólicos, procesos intermedios los cuales culminan en la reproducción de los mismos, generación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Los sistemas más empleados son: lodos activados, filtros de escurrimientos, lagunas aireadas y sistemas biológicos rotativos.

➤ *Lodos activados*: son un proceso de tratamiento en el cual el agua residual y el lodo biológico (microorganismos) son mezclados y aireados en un tanque denominado aireador, los flóculos biológicos formados en este proceso se sedimentan en un tanque lugar del cual son recirculados nuevamente al tanque aireador, en este proceso los microorganismos son completamente mezclados con la materia orgánica en el agua residual de manera que estas les sirva de alimento para su producción. La mezcla o agitación se efectúa por medio mecánico los cuales tienen doble función, producir una mezcla completa y agregar oxígeno al medio para que el proceso se desarrolle.

➤ *Filtros de escurrimiento*: los filtros de escurrimiento son dispositivos para aireación rápida de desechos domésticos o industriales que contienen biodegradables orgánicos. El medio sirve como sustrato sobre el cual crece un lodo de microorganismos, los desechos fluyen o escurren por gravedad sobre el relleno cubierto de lodo. El aire desciende a través del relleno por corriente natural o forzadas contra corriente a la descendente de desecho, los microorganismos aeróbicos en el lodo digieren la materia orgánica en presencia del oxígeno difundido dentro del lodo. Los

filtros de escurrimiento tienen un amplio uso debido a la simplicidad de su construcción, la facilidad y bajo costo de operación y mínimos requerimientos de mantenimiento.

➤ *Lagunas aireadas:* son embalses de agua servida que ocupan una gran superficie de terreno. El agua servida se oxigena mediante aireadores superficiales o difusores sumergidos para generar oxigenación bacteriana, estos dispositivos crean una turbulencia que mantienen la materia en suspensión, el tiempo normal de residencia de este proceso es de tres a seis días, tiempo en que las bacterias poseen un crecimiento acelerado. La separación de los sólidos en este tratamiento se logra por decantación que demora de seis a 12 horas. La calidad del efluente en este proceso es inferior al del lodo activado cuya diferencia fundamental es que en las lagunas aireadas no hay recirculación de lodos.

➤ *Sistemas biológicos rotativos:* son sistemas de tratamientos de depuración de aguas que consisten en baterías de discos de diversos materiales colocados en paralelo que se van sumergiendo secuencial y parcialmente en un depósito por donde circula el agua a tratar sobre dicho soporte se adhiere y desarrolla una biomasa activa procedente del agua residual la cual realiza el efecto depurador del sistema. [5]

### **2.1.3. Métodos de tratamiento químico**

Los tratamientos químicos se basan en reacciones químicas de oxidación - reducción en las cuales cambian los estados de oxidación de las especies involucradas. Entre los oxidantes más comunes para el tratamiento de las aguas se encuentran el cloro, el yodo, la plata y el permanganato de potasio.

➤ *Cloro:* el tratamiento con cloro es el más conocido debido a que es empleado en los sistemas de aguas públicas, el cloro sin embargo presenta una serie de problemas en el tratamiento de aguas, debido a que este reacciona con la materia orgánica formando compuestos que reducen la cantidad de cloro libre para la

desinfección generando los trihalometanos, sustancias cancerígenas. A menos que el cloro libre sea medido la desinfección puede no ser garantizada con dosis moderadas de cloro, una solución es la supercloración, que es la adición de una mayor cantidad de cloro de la necesaria, luego se puede remover el exceso de cloro a través del filtro de carbón activado o añadir agua oxigenada para desactivar el cloro, comúnmente se utiliza una solución que contiene 5,25% p/p de hipoclorito de sodio.

➤ Yodo: el yodo como agente para la purificación del agua emergió a partir de la segunda guerra mundial, cuando las fuerzas armadas norteamericanas buscaron un reemplazo para las tabletas de halazone. El yodo demostró ser de muchas maneras superior al cloro para el tratamiento de lotes pequeños de agua, es menos sensible al pH y al contenido orgánico del agua y es efectivo en pequeñas dosis, sin embargo hay personas que son alérgicas al yodo y existen dudas sobre su uso a largo plazo. El agua tratada con yodo puede presentar sabores desagradables que pueden ser removidos por tratamiento con ácido ascórbico.

➤ Plata: la plata puede ser empleada en forma de sal, comúnmente nitrato de plata, formando una suspensión coloidal. Existen algunos estudios que sugieren que la plata depositada en filtros de bloque de carbón puede eliminar agentes patógenos sin la necesidad de añadir plata al agua

➤ Permanganato de Potasio: el permanganato de potasio no es ampliamente utilizado en el mundo desarrollado para la eliminación de patógenos. Es mucho más débil que las otras alternativas, es más caro y deja un objetable tono rosado o café. Si debe ser usado, entonces 1 gramo por litro probablemente sería suficiente en contra de bacterias y virus (no existen datos disponibles acerca de su efectividad en contra de quistes protozoos).

#### **2.1.4. Otros procedimientos utilizados para la potabilización del agua**

➤ *El Ozono:* El ozono es una molécula compuesta por tres átomos de oxígeno, se forma exponiendo aire u oxígeno a una descarga eléctrica generada por

una fuente de alto voltaje. Es mucho más efectivo como desinfectante que el cloro y no presenta residuos después de su reconversión a oxígeno. En el tratamiento con ozono se eliminan virus, bacterias y microorganismos en general cloro-resistentes. Al poseer un elevado potencial de oxidación es posible precipitar metales pesados que pueden encontrarse en disolución y eliminar compuestos orgánicos, pesticidas y todo tipo de olores y sabores extraños que el agua pudiese contener. Otra de las ventajas que el tratamiento con ozono ofrece sobre el cloro es la rapidez con la que actúa lo cual permite realizar tratamientos muy efectivos en pocos segundos o minutos.

➤ *Luz ultravioleta:* la luz ultravioleta elimina agentes patógenos, si el agua está al descubierto para recibir suficiente luz, entonces los agentes patógenos serán eliminados. El problema es que algunos agentes patógenos como los quistes protozoos son centenares de veces menos sensitivos a la luz UV que otros, aunque estos agentes patógenos son fáciles de remover con filtros mecánicos. La eficiencia del tratamiento depende la turbidez del agua, ya que mientras mas opaca menor será la cantidad de luz transmitida a través de ésta. Otro problema que presenta el tratamiento UV es que el daño hecho a los agentes patógenos puede ser revertido si el agua es expuesta nuevamente a la luz visible a través de un proceso conocido como la fotoreactivación. Aunque esta técnica es una técnica limpia ya que no deja residuos como resultado del tratamiento de desinfección presenta varias desventajas en cuanto a los costos ya que son superiores, posee una menor confiabilidad y carece de un desinfectante residual.[5]

## **2.2. Procedimientos establecidos para el tratamiento de fenoles**

El tratamiento biológico directo de muchas corrientes de aguas residuales que contienen contaminantes orgánicos tóxicos poco biodegradables como el fenol y los compuestos fenol-sustituídos no es factible. Es por esto que se hace necesario el uso de técnicas menos convencionales para lograr su oxidación, aunque dichas técnicas

puedan ser demasiado costosas cuando se intenta obtener una oxidación completa a dióxido de carbono de todos los compuestos orgánicos presentes. Es posible realizar una oxidación parcial como un paso preliminar a la eliminación definitiva a través de procesos biológicos naturales. Entre los métodos más empleados en la actualidad para el tratamiento de fenoles y fenoles-sustituidos se encuentran los siguientes

### **2.2.1 Extracción**

En este proceso se utiliza un solvente y se ponen en contacto dos fases insolubles (fase acuosa y solvente), lográndose la transferencia de masa del contaminante desde la fase acuosa hacia el solvente, por el cual el fenol tiene gran afinidad. La extracción de fenoles con solventes es económicamente justificable cuando la concentración es superior a 1000 mg/L. Las pérdidas por solvente y la corriente fenol-solvente crean problemas adicionales de contaminación. Después de la extracción con solventes y la etapa de agotamiento, los fenoles están todavía presentes en niveles de cientos de mg/l. Es evidente que el tratamiento del efluente de aguas residuales por este método es complejo y costoso.

### **2.2.2 Adsorción**

La adsorción es la transferencia de masa del contaminante desde la fase acuosa hacia una superficie sólida (adsorbente), el nivel de adsorción depende en general del tipo de adsorbente, del contaminante y de la temperatura. Los compuestos fenólicos se pueden adsorber sobre una serie de materiales como carbón activado, resinas poliméricas sintéticas y biopolímeros. Una vez el contaminante se encuentre adsorbido se debe realizar algún tipo de tratamiento para reutilizar el adsorbente y obtener el fenol

a mayor concentración. Sus principales desventajas son los costos derivados de la regeneración o disposición final, la tendencia a formar obstrucciones hidráulicas y la necesidad de adicionar material para compensar las pérdidas. Los adsorbentes poliméricos sintéticos, poseen una alta selectividad y mayor resistencia mecánica pero tienen un costo muy elevado.

### **2.2.3 Intercambio iónico**

Se emplea para la remoción de fenoles en estado ionizado y se justifica la utilización de este proceso cuando la concentración de fenol es superior a 1000mg/L. El fundamento de este proceso es el intercambio de un ión en la estructura del material de intercambio, por un ión en solución; posteriormente el material de intercambio debe regenerarse y el fenol se obtiene a mayor concentración. Presenta como principal desventaja su alto costo.

### **2.2.4 Tratamiento electroquímico**

La electro oxidación es uno de los procesos que ha sido estudiado a escala de banco para el fenol y algunos fenoles sustituidos. Algunos electrodos modificados con películas de  $PbO_2$  son promisorios en la degradación electroquímica de cloroaromáticos. La desventaja de este proceso es su costo elevado.

### **2.2.5 Oligomerización enzimática**

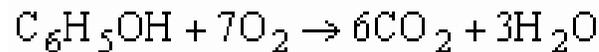
En este campo se aprovecha la posibilidad de ciertas sustancias (óxidos de magnesio y de hierro y manganeso) y enzimas (polimerasas) para sustraer del medio oxígeno elemental y llevar a cabo una oxidación secuencial que da como resultado la formación de enlaces C – O – C entre anillos fenólicos, generando compuestos de mayor peso molecular. Su principal desventaja se presenta en el crítico control de los procesos, siendo necesario garantizar temperaturas inferiores a 40° C, pH entre 6.5 y 7.5 y concentración del alimento no superior a 200 ppm., para evitar una disminución en la actividad enzimática, que tiene carácter irreversible.

### **2.2.6 Biodegradación**

En este proceso los microorganismos utilizan los compuestos presentes en el agua (en este caso el contaminante) como fuente de carbono y energía, transformándolos en biomasa, gas carbónico y otros intermediarios. Los procesos de biodegradación para estos efluentes fenólicos han sido reportados desde hace algunos años, pero debido a su toxicidad, aun a concentraciones bajas (200mg/L), pueden afectar gravemente el proceso, inhibiendo el crecimiento microbiano o convirtiéndose en biocida. Algunos fenoles son intrínsecamente refractarios (No biodegradables) otros compuestos usualmente presentes en estas aguas pueden también afectar la eficiencia del proceso. La biodegradación es muy sensible a cambios inesperados en las concentraciones de las corrientes de alimentación, las cuales pueden matar los microorganismos o disminuir considerablemente la velocidad del proceso. Así mismo, se requieren grandes volúmenes de almacenamiento, pues los tiempos de residencia pueden ser de varios días.

### 2.2.7 Incineración

La incineración es una técnica usada para la destrucción de fenoles y de compuestos aromáticos clorados. El fenol se destruye transformándose en dióxido de carbono y agua:



La EPA exige 1600°C como temperatura de operación para este proceso, lo que convierte a esta opción una forma costosa de tratamiento, además se producen algunos subproductos por la combustión incompleta. La incineración catalítica puede llevarse a cabo a temperaturas más bajas, pero los átomos de cloro producto de la combustión envenenan o reducen la capacidad de la mayoría de los catalizadores.

### 2.2.8 Oxidación con agua supercrítica

Por encima de su punto crítico el agua se transforma en un medio único de reacción, donde los hidrocarburos y el oxígeno molecular tienen una solubilidad infinita. Por estas propiedades el agua supercrítica es atractiva para la oxidación de fenoles, clorofenoles y bifenilos policlorados. Las principales desventajas de este sistema son los requerimientos de altas temperaturas (450 - 500 °C), altas presiones (240 - 300 atm) y oxígeno molecular puro, así como también problemas de corrosión. Todos estos hechos hacen que esta tecnología sea costosa.

### 2.2.9 Degradación de contaminantes por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV

La radiación UV degrada los compuestos aromáticos clorados. Los fenoles son convertidos en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en quinonas con eliminación de HCl.

### **2.2.10 Degradación de contaminantes por O<sub>3</sub>/UV**

El pentaclorofenol (compuesto ampliamente usado como pesticida y preservativo de la madera) y el lindano son eficientemente degradados por O<sub>3</sub>/UV en bajas concentraciones (50 -60µg/L) por irradiación con una lámpara de mercurio durante 1 hora. Un método industrial más promisorio es la combinación de O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con irradiación ultravioleta.

### **2.2.11 Degradación de contaminantes por TiO<sub>2</sub>/UV**

En las ultimas dos décadas, la aplicación de la fotocatalisis de semiconductores a la degradación de contaminantes orgánicos ha sido ampliamente desarrollada. Los principales inconvenientes del proceso TiO<sub>2</sub>/UV el relativo bajo rendimiento cuántico (<0.05); además la recuperación de las micropartículas de oxido de titanio del agua no es un proceso fácil, lo cual hace necesario la búsqueda de nuevos métodos para la inmovilización del catalizador.

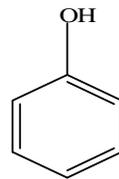
### **2.2.12 Degradación de contaminantes por sonoquímica**

Por medio del ultrasonido el agua presente en soluciones acuosas se descompone mediante una ruptura hemolítica, dando como resultado radicales hidrófilos y átomos de hidrógeno. Estas dos especies producen una mezcla reactiva de naturaleza química oxidativa y reductiva. Este método ha sido usado para oxidar solventes clorados como el pentaclorofenol. En la actualidad ya hay reactores a gran escala comercialmente disponibles

La base del tratamiento de separación de contaminantes en efluentes acuáticos en este trabajo se basa en la extracción del fenol y los fenoles sustituidos. A continuación se hace una breve descripción de estos compuestos.

### 2.3. Fenol

Es un hidrocarburo aromático cuya base es el benceno y un grupo hidroxílico como sustituyente y su estructura es la siguiente [6]:

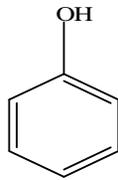


El término fenol involucra a los derivados del benceno cuyos átomos de hidrógeno han sido sustituidos por grupos hidroxilo entre lo que se encuentran los monohidroxidos y sus derivados (cresoles, halogenados, nitrados); los dihidroxidos y sus derivados (catecol, resorcinol, quinol) y los polihidroxiderivados.

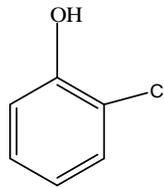
Los fenoles tienen un amplio uso como bactericidas y en una gran cantidad de procesos industriales es por esto que se encuentran en muchos efluentes acuáticos ya que están presentes en los desechos industriales de: refinerías petroleras, plantas de papel, coke, jabones, detergentes, textiles, industria maderera, químicos orgánicos, plásticos y sintéticos, etc. Estos compuestos son tóxicos, algunos a niveles de partes por millón (entre 1-10) otros a niveles de partes por billón; es por esto que la eliminación y degradación de dichos compuestos se ha convertido en prioridad para las agencias de control ambiental a nivel mundial. [1, 3,6]

Existen 11 compuestos fenólicos considerados como contaminantes de remoción prioritaria para la EPA y la UE debido a su uso frecuente en diferentes procesos industriales, estos compuestos son:

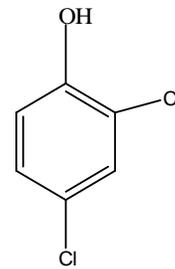
Fenol (Ph), 2-clorofenol (2-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,5-TCP), 2-nitrofenol (2-NP), 4-nitrofenol (4-NP), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP), 2,4-dimetilfenol (2,4-DMP), 2-metil-4,6-dinitrofenol (2-M-4,6-DNP), 4-cloro-3-metilfenol (4-C-3-MP), pentaclorofenol (PCP) y sus estructuras son:



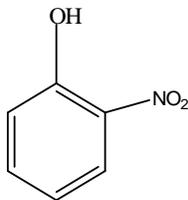
Ph



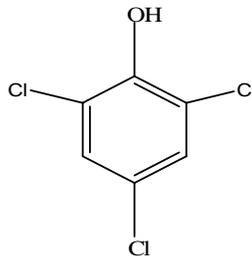
2-CP



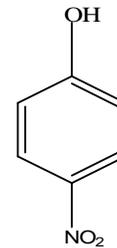
2,4-DCP



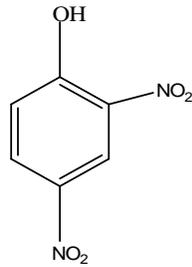
2-NP



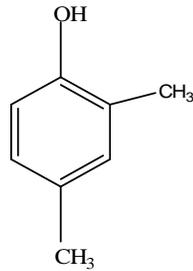
2,4,6TCP



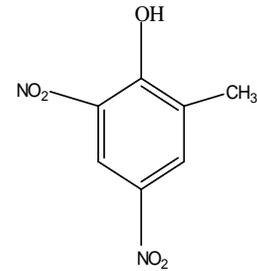
4-NP



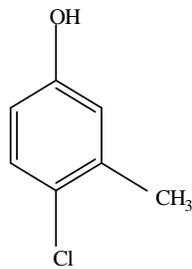
2,4-DNP



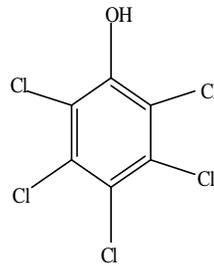
2,4-DMP



2-M-4,6DNP



4-C-3-MP



PCP

Los valores máximos permitidos para el contacto con el organismo varían desde los 5mg/L para el fenol hasta 0,5mg/L para el PCP [7]. Estos ejemplos ilustran acerca de la elevada toxicidad que poseen estos compuestos ya que los límites para el contacto son bajos. Otro de los riesgos que representan estas sustancias para el medio ambiente es que estos compuestos no son degradados por los organismos acuáticos por lo que se van acumulando en el tiempo al no se convertidos en compuestos inocuos para el ambiente ni para los organismos que habitan estos cuerpos de aguas. El contacto prolongado efluentes contaminados con fenoles produce la acumulación de estos compuestos en los organismos acuáticos y si estos son consumidos por los seres humanos se produce un proceso denominado bioacumulación, que consiste en la acumulación de compuestos nocivos a subir escalones en la cadena trófica, puesto que estos compuestos tampoco son degradados por el sistema digestivo de nuestros

cuerpos; lo que convierte a estas sustancias en veneno silencioso para los seres humanos. Los síntomas que produce la intoxicación con los diferentes fenoles son muy variados y pueden confundirse con malestares producidos por enfermedades comunes pero una vez que los valores de contaminación del organismo son elevados, estos pueden causar fallas hepáticas, renales, cardíacas y en el sistema nervioso central llegando hasta causar la muerte.

Organismos Internacionales encargados del control y la conservación del medio ambiente como la EPA y la UE, en sus legislaciones incluyen límites máximos permitidos para los fenoles individuales de  $1\mu\text{g/L}$  y de  $5\mu\text{g/L}$  para los fenoles totales. En Venezuela los límites permitidos en la legislación son  $2\mu\text{g/L}$  para los fenoles totales en cuerpo de aguas usados para el consumo humano y  $0,5\text{mg/L}$  para fenoles en el vertido de desechos en efluentes acuáticos [1,4].

Estos valores de concentraciones tan bajos para la regulación de los fenoles crean un problema a la hora de su determinación, porque si bien es cierto que el método fotocolorimétrico de las antipirinas que es el método estándar de análisis y determinación de fenoles totales, permite realizar determinaciones de fenoles a bajas concentraciones mediante un proceso de preconcentración a través de una extracción con cloroformo, este método presenta como limitante el no poder determinar compuestos fenólicos para-sustituídos donde la sustitución sea un grupo alquilo, arilo, nitro, benzoílo, nitroso o aldehído.

Muchas veces estos compuestos se encuentran como trazas en las soluciones acuosas lo que dificulta su determinación si el método no posee la sensibilidad adecuada. Otra técnica alternativa para la determinación de fenoles es la HPLC en la cual se puede trabajar en diferentes condiciones con el fin de optimizar el procedimiento de separación y determinación de estos analitos; y una vez optimizado el proceso dependiendo de los equipos es posible automatizarlos lo cual trae como beneficio la

menor manipulación de operador durante el proceso evitándose los errores que este pueda cometer. A continuación se realiza una breve descripción de la cromatografía, de los distintos tipos de procedimientos cromatográficos existentes y en especial se realiza un enfoque en la HPLC que será la técnica aplicada en esta investigación.

## **2.4. Cromatografía**

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Existen una serie de conceptos y parámetros utilizados en la cromatografía los cuales permiten la identificación y cuantificación de los diferentes analitos presentes en las diferentes mezclas así como la determinación de la efectividad del proceso de separación, estos conceptos son descritos a continuación:

➤ *Cromatograma*: Si colocamos un detector al final de la columna que responde a la concentración del soluto y se registra su señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido) se obtiene una serie de picos que representan un gráfico denominado cromatograma. Este gráfico es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

➤ *Tiempo muerto ( $t_M$ )*: Es el tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector; es el tiempo necesario para que, en promedio, una molécula de la fase móvil pase a través de la columna

➤ *Tiempo de retención ( $t_R$ )*: Es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector; es el tiempo que tarda en aparecer el máximo de un pico, considerándose esto como el tiempo que tarda el analito en salir de la columna.

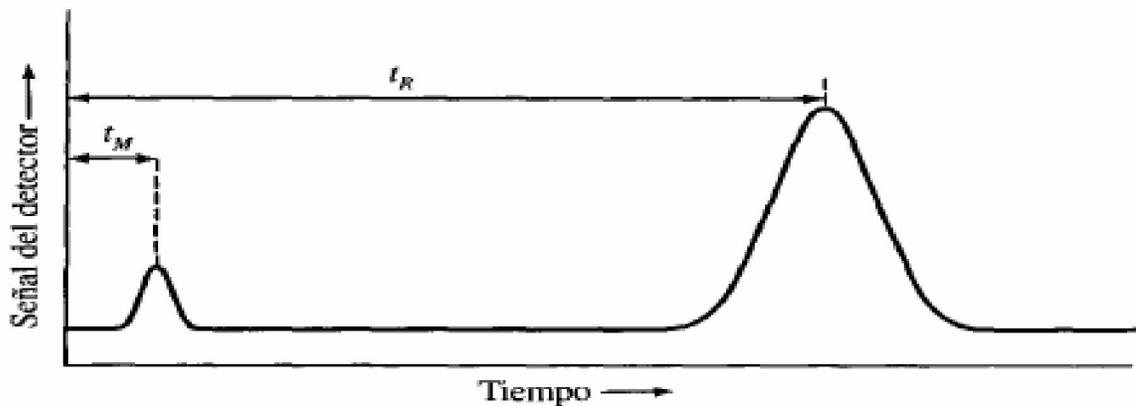


Figura 1. Cromatograma en el que se representan las señales del detector en función del tiempo y que muestra el tiempo muerto y el tiempo de retención del analito

➤ *Constante de distribución (K)*: describe la relación del equilibrio de distribución y transferencia del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se define como:

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

Donde  $C_S$  es la concentración Molar del soluto en la fase estacionaria y  $C_M$  la concentración molar de soluto en la fase móvil.

➤ *Factor de capacidad o factor de retención (k)*: describe la velocidad de migración de los analitos en la columna. Para un soluto determinado se define como:

$$k_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Donde  $K_A$  es el coeficiente de distribución de la especie A,  $V_S$  es el volumen de la fase estacionaria y  $V_M$  es el volumen de la fase móvil. Cuando el factor de capacidad para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención, estos son demasiado cortos. En cambio cuando el factor de retención es del orden de 20 o 30 o tal vez mayor, los tiempos de retención son excesivamente largos.

➤ *Factor de selectividad ( $\alpha$ )*: El factor de selectividad  $\alpha$  de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad \alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad \alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Donde  $K_B$  es el coeficiente de distribución para la especie más fuertemente retenida B, y  $K_A$  es el coeficiente de distribución para la menos retenida, o que eluye con más rapidez, la especie A. Según esta definición  $\alpha$  siempre es mayor que la unidad, por que B es el compuesto más retenido (de  $> t_R$ ). Donde  $k_B$  y  $k_A$  son los factores de capacidad de B y de A, respectivamente.

➤ *Resolución cromatográfica* ( $R_S$ ): es la medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos. Se define como:

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad R_S = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B}$$

- Donde  $W_A$  y  $W_B$  son la anchura de los picos A y B.
- Si el valor de  $R_S$  es mayor de 1.5 se consideran resueltos los picos en el cromatograma; no será así si  $R_S$  es menor de 1.5

➤ *Eficiencia en cromatografía*: La eficiencia se define en base a dos términos, que son medidas cuantitativas de la eficiencia de una columna: 1º *la altura del plato H* y 2º *el número de platos N*. Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H}$$

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos, y cuanto menor es la altura de plato. Existen diferencias en las eficacias por diferencias en el tipo de columna y/o el tipo de fases móvil y estacionaria. Las eficacias en términos de número de platos varían de cientos a miles, y las alturas de plato de unas pocas décimas a milésima de centímetro o menos.

Existe otra ecuación para calcular el número de platos N:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

En este caso  $N$  se puede calcular a partir de dos medidas de tiempo,  $t_R$  y  $W$  (anchura del pico); para calcular  $H$ , se ha de conocer también la longitud del relleno de la columna  $L$ . [8]

### **2.4.1. Tipos de separaciones Cromatográficas**

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto, diferenciándose así la cromatografía en columna de la cromatografía en plano o cromatografía plana. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual hace se pasar la fase móvil por presión o gravedad. En la cromatografía en plano o plana, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de la gravedad. Con fines de esta investigación el desarrollo teórico se basará en la cromatografía en columna; a los conceptos desarrollados para la cromatografía en columna se adaptan también para la cromatografía plana. Otra clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. La Tabla que se presenta a continuación da la relación de las tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos. Como su nombre indica las fases móviles en las tres técnicas son, respectivamente, líquidos, gases y fluidos supercríticos. Hay que mencionar que solamente la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas; por otra parte, tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna, de tal modo que las paredes de la columna contienen la fase móvil.

Tabla 1. Clasificación de los métodos de cromatografía en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y superficie enlazada

## 2.5. Cromatografía en Columna

La Figura 2 que se muestra a continuación muestra como dos sustancias A y B se separan en una columna por cromatografía de elución con una fase móvil. La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición en forma continua de nueva fase móvil. El proceso empieza cuando una única porción de la muestra se introduce en la parte superior de la columna (tiempo  $t_0$ ) después de lo cual los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases, La introducción de fase móvil adicional, el eluyente, hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde tienen lugar un posterior reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de la fase estacionaria a las que accede

(tiempo  $t_1$ ). Al mismo tiempo, tiene lugar una distribución entre el disolvente nuevo y la fase estacionaria en el lugar en el que inicialmente se ubicaba la muestra.

Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas de soluto (analitos) por la columna en una serie de continuas transferencias entre las fases estacionaria y móvil. Sin embargo, debido a que el movimiento de los solutos solo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de soluto migra en la columna depende de la fracción de tiempo que reside en esta fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria (compuesto B) y es grande cuando es más probable la retención en la fase móvil (componente A). Las diferencias de velocidad que resultan hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas o zonas, que se localizan a lo largo de la columna (tiempo  $t_2$ ). El aislamiento de las especies separadas se realiza haciendo pasar suficiente cantidad de fase móvil a través de la columna hasta que las bandas individuales salen de ella, pudiendo así detectarse o reconocerse (tiempos  $t_3$  y  $t_4$ ).

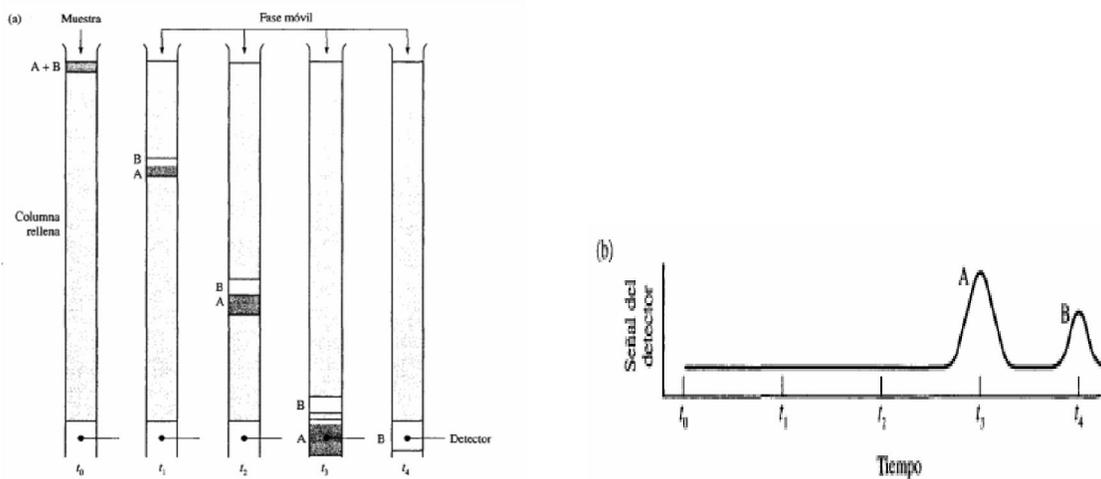


Figura 2. Cromatografía en columna de elución con una fase móvil y detección de los compuestos A y B

Durante la elución en la columna cromatográfica de los distintos analitos de la muestra ocurre un proceso asociado y muy importante, la dilución del analito, proceso que acompaña casi siempre a las separaciones. Así el tamaño de la banda original que

contiene los analitos es notablemente más pequeño que cualquiera de las zonas que llegan al detector, lo que significa que se produce una importante dilución de los analitos (su concentración disminuye) mientras están siendo separados. Es evidente que el movimiento de avance por la columna aumenta la distancia entre las bandas. Sin embargo, al mismo tiempo tiene lugar un ensanchamiento de ambas zonas, lo que disminuye la eficacia de la columna como sistema de separación. Existen condiciones en las que se puede lograr que el ensanchamiento de bandas se de mas lentamente que la separación. La cromatografía en columna es uno de los principales métodos para la separación de especies químicas. Además, se puede emplear para la identificación tanto cualitativa como para la determinación cuantitativa de las especies separadas

La cromatografía en columna es también un buen método que proporciona información cuantitativa acerca de las especies separadas, basándose en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones. Pudiéndose hacer así análisis cuantitativos basados en la altura del pico, en las áreas del los picos, mediante el método de calibrado y patrones, el método del patrón interno, y por ultimo el método de la normalización de las áreas.

## **2.6. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC)**

La cromatografía de líquidos de alta resolución o eficacia es la técnica analítica de separación con el uso más amplio, esto se debe a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y su aplicabilidad a sustancias de gran interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para le sociedad en general. Como en todos los procesos las cromatográficos en las que la fase móvil es un líquido, se basa primordialmente en la interacción de los analitos a separar con la fase estacionaria y la

fase móvil, pero a diferencia de los otros procedimientos las columnas son empacadas con sólidos con diámetros de partículas inferiores y el flujo de la fase móvil se realiza a altas presiones con la ayuda de bombas diseñadas con este fin. La cromatografía de líquidos de alta eficacia se utiliza para diferentes aplicaciones que muchas veces son complementarias las cuales se pueden clasificar de acuerdo a la interacción de los analitos con la fase estacionaria en: cromatografía de absorción, cromatografía de reparto, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Como la cromatografía de reparto va a ser la utilizada en la investigación solo se va a desarrollar esta clasificación de la cromatografía.

### **2.6.1. Cromatografía de Reparto**

La cromatografía de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos de uso mas amplio de las cuatro modalidades de cromatografía de líquidos, en el pasado solo se aplicaba a compuestos polares, no iónicos con baja o moderada masa molecular, sin embargo los desarrollos de métodos como la formación de pares iónicos y la formación de derivados han ampliado el campo de la cromatografía de reparto hasta compuestos iónicos. Este tipo de cromatografía se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y cromatografía de fase unida químicamente. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del relleno. [8]

En la cromatografía líquido-líquido (CLL) la fase estacionaria esta formada por un recubrimiento líquido sobre el soporte de la columna, una de las desventajas es la pérdida de fase estacionaria por dilución en la fase móvil, lo que hace necesario un recubrimiento periódico de las partículas del soporte. Por otra parte, el problema de dilución de la fase estacionaria impide el uso de los rellenos de fase líquida en la

elución con gradiente. La cromatografía de reparto en un principio era solo del tipo líquido-líquido, sin embargo en la actualidad los métodos de fase unida químicamente son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquido.

La cromatografía de fase unida químicamente (CFQU) surgió como consecuencia de problemas asociados con la CLL. En esta técnica, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte; en general, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones donde la sílice es el elemento básico. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes. Los rellenos de columna en la CFQU se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento enlazado tiene carácter no polar y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares. Si se varía la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria es posible obtener diferentes tipos de selectividad. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino y el grupo nitrilo en el caso de la cromatografía de fase normal, o bien no polar como el grupo octilo, octadecilo, fenilo, etc. en el caso de la cromatografía de fase inversa

### 2.6.2. Instrumentación

Los equipos utilizados comúnmente para HPLC poseen cuatro partes fundamentalmente, la primera parte consta de recipientes para almacenar la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los solventes, la segunda parte es el sistema de bombeo, luego la columna de análisis y por último el sistema de detección y registro.



Los aparatos modernos de HPLC están equipados con uno o mas recipientes de vidrio o acero inoxidable que pueden contener volúmenes entre 200 y 1000 mL, estos recipientes se pueden equipar con sistemas de desgasificación y de filtración de polvo y de partículas en suspensión en el solvente; todos estos mecanismos son colocados para cuidar la columna de burbujas y sólidos que puedan dañarla o afectar su normal funcionamiento.

➤ *Bombas:* Las bombas tienen la función de proveer un flujo continuo del eluyente a través del inyector, la columna y el detector. Los sistemas de bombeo para HPLC deben cumplir una serie de requisitos rigurosos como: la generación de presiones por encima de 6000 psi, flujo libre de pulsaciones, intervalos de caudales de 0,1 a 10 mL/min, control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5%, componentes resistentes a la corrosión. Las hay de tres tipos, bombas recíprocas, bombas de desplazamiento y bombas neumáticas.

Las bombas recíprocas producen el desplazamiento de un flujo pulsante de volumen constante, que debe ser amortiguado, lo cual se hace mediante un capilar de 1 a 6 m de longitud colocado entre la bomba y la cámara de inyección. Son adecuadas para la elución en gradiente y no tienen límite en cuanto al volumen a bombear; son utilizadas en un 90 % de los equipos, existen algunas que combinan dos pistones de manera que mientras un pistón carga el otro pistón bombea lo cual provee un flujo constante y libre de pulsos.

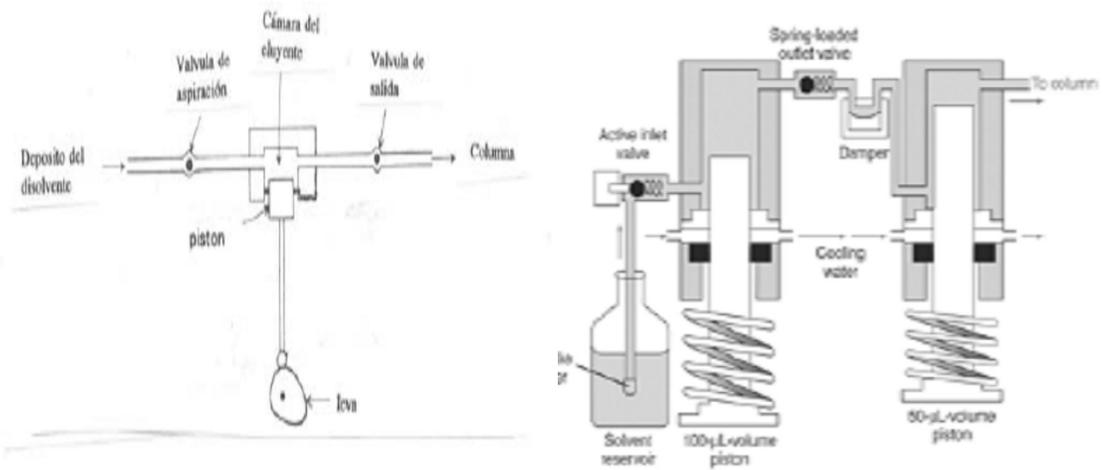


Figura 3. Bomba recíproca

➤ *Sistema de inyección:* Es un dispositivo integrado en el equipo cromatográfico que permite la inyección de la muestra en las condiciones de presión de la fase móvil. Consiste en bucles o válvulas con capacidad para un determinado tamaño de muestra y una jeringa para inyectar la muestra. Los inyectoros deben introducir muestras líquidas en un rango de volumen desde 0,1 µl a 100 µl con una alta precisión y alta presión. Normalmente se usan inyectoros que poseen válvulas de 6 puertos con un bucle que permite no solo la inyección de muestra sino también la purga del sistema y la eliminación de burbujas

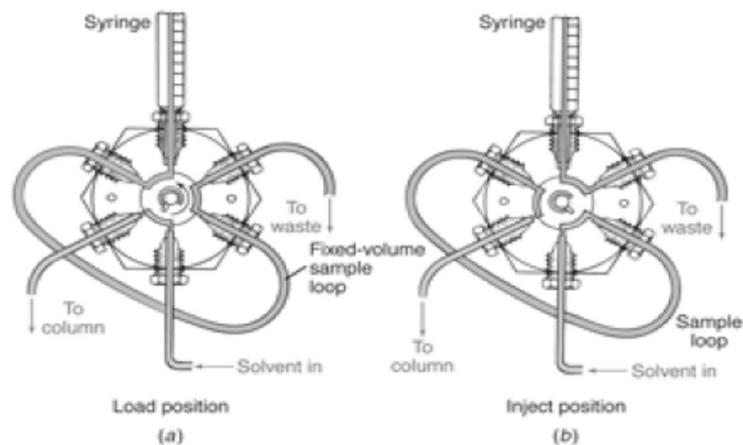


Figura 4. Sistema de inyección

➤ **Columnas:** Las columnas para este tipo de cromatografía se construyen comúnmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, los tamaños y rellenos varían según el fabricante parámetros que influyen en los costos de la columna que se requiera para el análisis. Las columnas son rectas con una longitud entre 10 y 30 cm, y un diámetro interior de 4 a 10 mm; las partículas de relleno más comunes son de 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo general los rellenos utilizados son gel de sílice y alúmina, también se emplean partículas peliculares, que consisten en esferas de vidrio de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro cubiertas con una capa de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de material poroso como gel de sílice, alúmina, etc. Estas columnas tienen alrededor de 50.000 platos teóricos/m. Para aumentar la vida de la columna, se puede instalar una precolumna, delante de la columna que permita eliminar las impurezas del disolvente y saturar la fase móvil de fase estacionaria. El relleno es químicamente igual al de la columna, pero con un tamaño de partícula mayor que el de aquélla, para que la caída de presión a lo largo de la precolumna sea lo menor posible.

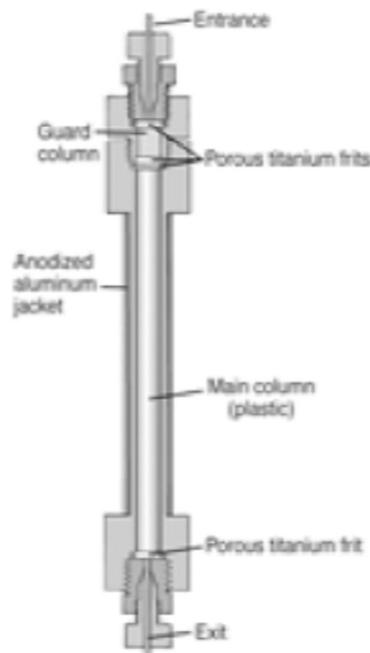


Figura 5. Columna para HPLC

Los desarrollos cromatográficos, generalmente, se realizan a temperatura ambiente; sin embargo, los cromatógrafos actuales disponen de un horno termostatzado para la columna que puede controlar la temperatura hasta los 150°C. Estos son importantes para mantener la columna a una temperatura óptima, sobre todo en análisis cualitativo, puesto que las variaciones de temperatura pueden cambiar la viscosidad del eluyente e influir en el volumen retenido.

➤ *Detectores:* Los sistemas de detección en cromatografía de líquidos no son tan universales como los detectores de cromatografía de gases ya que en esta técnica se pueden analizar una mayor cantidad de compuestos y manejar un mayor número de variables para la detección de los analitos. Los detectores para cromatografía de líquidos se pueden clasificar de acuerdo al principio en el que se basan en dos grupos. Los que se basan en la medida de una propiedad de la disolución responden a una propiedad del efluente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. En el otro grupo se encuentran los detectores basados en una propiedad del soluto y responden a alguna de las propiedades del analito como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente límite que no son inherentes a la fase móvil.

El detector de luz visible/ultravioleta es básicamente un espectrofotómetro que mide el cambio que sufre un haz luminoso al atravesar la muestra, midiendo la absorbancia de las sustancias. Pueden ser de longitud de onda variable lo que permite determinar compuestos según la absorción de una determinada longitud de onda; o de arreglos de diodos que permiten recoger el espectro completo de la muestra y obtener cromatogramas tridimensionales útiles para la determinación cualitativa.

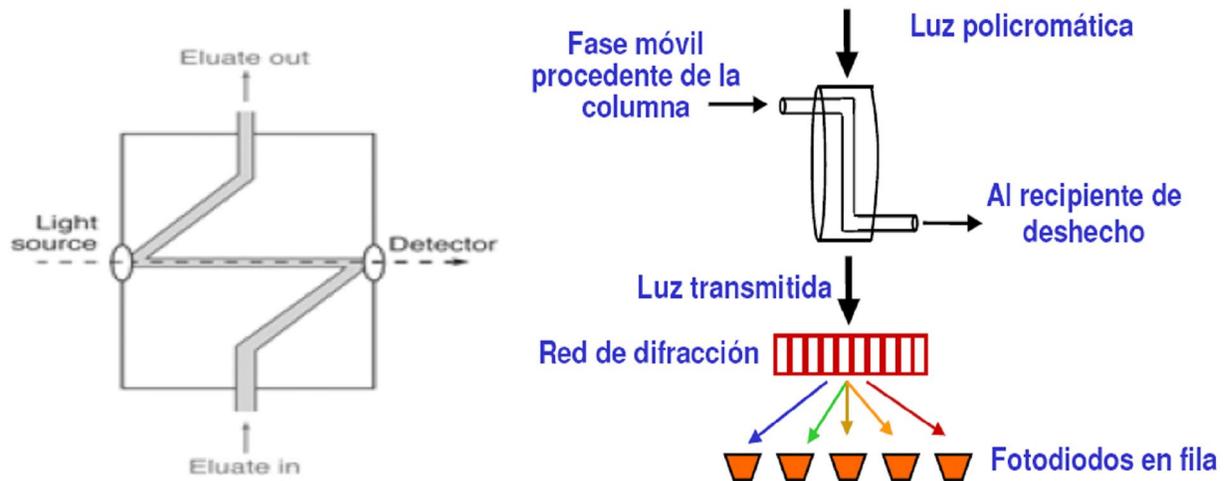


Figura 6. Detector de absorbancia (UV-VIS)

La HPLC presenta una ventaja de análisis respecto a la cromatografía de gases ya que las determinaciones se pueden realizar a temperatura ambiente; Esto permite la determinación de un mayor número de compuestos al no ser necesario que estos posean una alta volatilidad o que sean estables al aumentar la temperatura. Es aplicable a cualquier muestra líquida o soluble, las columnas son más eficientes ya que poseen mayor número de platos teóricos y se puede lograr la automatización del proceso. Pero en contraposición se debe tener en cuenta que se requiere de una instrumentación costosa lo que aumenta el costo de operación y no existe un detector universal y sensible.

En los últimos años se han diseñado una serie de procesos con la finalidad de preconcentrar hasta valores que permitan realizar cuantificaciones efectivas de los compuestos que se desean analizar; entre estas alternativas se utilizó la extracción líquido-líquido pero últimamente se ha dejado de lado debido a las complicaciones operativas que representaba, como la manipulación por largos periodos de solventes tóxicos y la contaminación del solvente de extracción por parte de la matriz de la muestra. Como alternativa a este procedimiento se empleó la extracción líquido-sólido o

extracción en fase sólida, la cual presenta ventajas en cuanto al tiempo de análisis, la manipulación de los solventes y las cantidades de muestra y solventes de elución empleados en el proceso. El método de extracción en fase sólida es descrito a continuación

## **2.7. Extracción en Fase Sólida**

La determinación de contaminantes orgánicos en muestras acuosas de forma directa siempre ha representado una dificultad experimental, debido a que generalmente estos contaminantes se encuentran en cantidades muy pequeñas y su cuantificación por los métodos analíticos disponibles en la actualidad de forma directa es difícil. Una relación entre los volúmenes de la disolución inicial y la solución final concentrada permite el cálculo entre la cantidad de analito en la muestra concentrada y su concentración en la muestra inicial. A mediados de la década de 1970 una nueva técnica fue introducida con la finalidad de proponer soluciones a los problemas que representaba la determinación de analitos que se encontraban a bajas concentraciones, esta técnica fue denominada Extracción en Fase Sólida (SPE). La SPE es una técnica de separación sólido-líquido basada en los mecanismos de separación de la cromatografía líquida clásica. Desde el punto de vista práctico, la SPE, en su forma más simple se comporta como una cromatografía líquida empleándose una pequeña columna abierta, usualmente denominada cartucho de extracción el cual contiene la fase sólida (que en cromatografía se denomina fase estacionaria). La solución que contiene el analito de interés se coloca en la parte superior del cartucho y es aspirada con un pequeño vacío o presionada lentamente con una jeringa o un gas de forma que la disolución penetre en el cartucho. Después que toda la fase líquida es drenada el analito retenido en el cartucho es eluido con un volumen pequeño de solvente de forma de recolectar el analito en una concentración adecuada para realizar el análisis. [9]

### 2.7.1 Métodos de operación en SPE

Entre los principales métodos de operación en SPE se destacan: la concentración del analito, aislamiento del analito, aislamiento de la matriz y la acumulación de muestra.

➤ *Concentración de analitos (enriquecimiento)*: el objetivo principal es pasar a través del cartucho, una gran cantidad de volumen de muestra, atrapando solamente al analito y dejando pasar el solvente y los interferentes. En la etapa siguiente se eluye el analito con una pequeña cantidad de solvente de manera que una vez recolectado, el analito se encuentre en una mayor concentración que en la muestra original. Una vez concentrada la muestra estará en un nivel de concentración apropiados para ser analizada directamente por una técnica adecuada.

➤ *Aislamiento del analito (clean-up)*: en este procedimiento el objetivo principal no es concentrar la muestra sino separar el analito de interés de las interferencias de la matriz, la finalidad es eliminar las interferencias por parte de la matriz en el análisis de la muestra por la técnica adecuada. Este procedimiento y el anterior no son mutuamente excluyentes, de forma tal que puede realizarse una concentración del analito y/o clean-up de la muestra en una misma extracción en fase sólida.

➤ *Aislamiento de la matriz*: en este procedimiento el objetivo es retener en la fase sólida las interferencias de la matriz, en vez de los analitos de interés (el cual pasa directo con el solvente de la muestra). El analito se recoge en un recipiente adecuado para el análisis y los interferentes son retenidos y desechados en el cartucho. Este procedimiento es usualmente utilizado para clean-up y no para concentración de la muestra.

➤ *Acumulación de muestra*: este procedimiento se emplea en el análisis de muestras que se encuentran en sitios distantes al laboratorio de análisis. En este caso los cartuchos son trasladados hasta la fuente de agua y se procede en la primera etapa

al análisis del lugar, que consiste en pasar el agua a través del cartucho de forma tal que los analitos queden retenidos. Posterior a esto el cartucho es almacenado a bajas temperaturas y transportado hasta el laboratorio de análisis. Una de las principales ventajas de este método es que se evita el transporte de grandes cantidades volúmenes de muestra, así como el análisis de compuestos lábiles o volátiles. Es importante realizar un estudio previo para conocer la estabilidad del o de los analitos, el cartucho a ser empleado, el tiempo de acumulación la temperatura, etc. [9]

## 2.8. Alúminas

La alúmina es un material cerámico compuesto de óxido de aluminio, sus propiedades la hacen especialmente apta para las aplicaciones en donde la temperatura es un factor crítico, además de su relativa facilidad para adaptarse a diversos trabajos y usos. Junto con la sílice es el ingrediente más importante en la constitución de las arcillas y los barnices, confiriéndole a estos materiales una mayor resistencia y aumentando su temperatura de maduración.

El óxido de aluminio existe en la naturaleza en forma de corindón y de esmeril. Ciertas piedras preciosas como el rubí, el zafiro, son formas de alúminas coloreadas por indicios de óxidos de metales pesados. La alúmina  $Al_2O_3$  se halla también en forma de óxidos hidratados que son los componentes de la bauxita y de la laterita. [5]

Las alúminas son óxidos de aluminio utilizadas como adsorbentes de impurezas y contaminantes en el tratamiento convencional de efluentes acuáticos. Se han desarrollado estudios que demuestran la efectividad de las alúminas funcionalizadas con surfactantes aniónicos, en la remoción de contaminantes orgánicos con eficiencia de remoción cercana al 90% con la posible regeneración del material adsorbente.

Las alúminas pueden presentar altas áreas superficiales con una alta afinidad hacia compuestos solubles en agua, por lo que no son efectivas en la adsorción de compuestos orgánicos poco solubles en agua. Al ser modificadas con surfactantes se aumenta la capacidad adsorptiva hacia compuestos orgánicos de interés ambiental.

### 2.8.1 Tipos de Alúminas

Las alúminas se clasifican en: Alúmina activada o adsorbente, Alfa Alúmina ( $\alpha$ , corindón), Alúmina tubular, Alúminas hidratadas y Gamma Alúmina ( $\gamma$ ). Para fines de esta investigación se desarrollara solo la gamma alúmina la cual se encuentra en el objeto del trabajo.

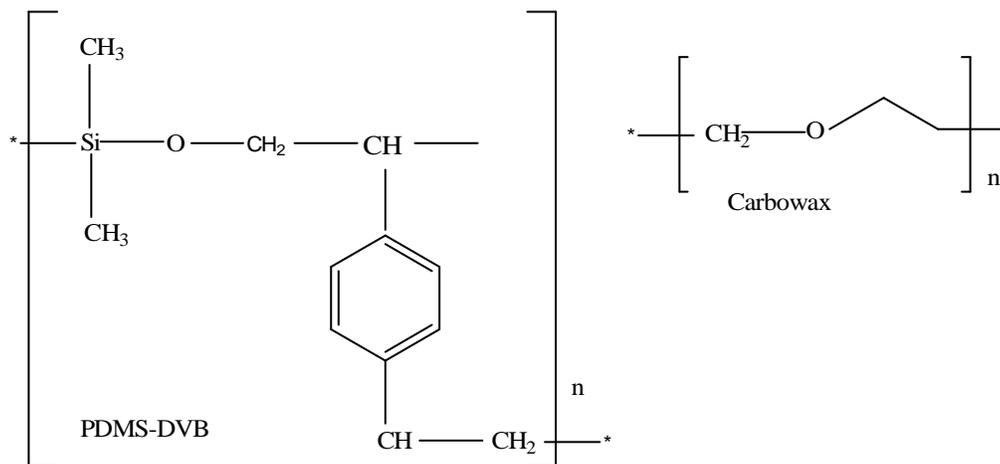
➤ *Gamma Alúmina ( $\gamma$ ):* es una forma cristalina intermedia del óxido la cual se obtiene por calentamiento de los trihidratos de alúmina o el alfa-monohidrato a 900 °C, los cuales pierden su agua combinada y forman la variedad cristalina denominada  $\gamma$ -Alúmina. Calentando la alúmina a mas de 1000°C., se convierte en  $\alpha$ -Alúmina. La formación de la  $\gamma$ -Alúmina en la descomposición de un hidrato es progresiva, y la imagen de difracción de los rayos X cambia en complejidad y precisión de líneas al aumentarse la temperatura de calentamiento. Las alúminas presentan como ventaja económica el bajo costo para su producción (450 dolares por tonelada) y representan una alternativa a otros medios adsorbentes como lo son las resinas de intercambio iónico y el carbon activado. [5]

Para fines de la presente investigación este tipo de alúmina se modificará con dodecilsulfato de sodio (SDS) para ser utilizada como adsorbente de un grupo de fenoles que se encuentran como contaminantes en medio acuoso mediante la extracción en fase sólida.

## 2.9. Antecedentes

En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de métodos y compuestos para la preconcentración de contaminantes ambientales en efluentes acuáticos. Muchos de estos procedimientos utilizan la SPE o SPME acoplada con HPLC con la finalidad de probar los diferentes compuestos empleados para la remoción de dichos contaminantes, entre los trabajos realizados en esta área se puede hacer una breve descripción de los siguientes:

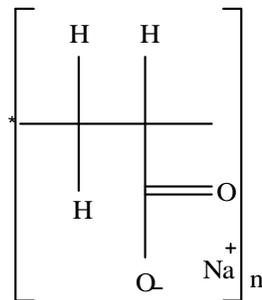
González-Toledo y col. (2001) realizaron un estudio comparativo entre dos fibras sintéticas utilizadas para preconcentrar fenoles mediante SPME y luego analizarlos por HPLC, las fibras que estudiaron fueron la resina templada carbowax y la otra fue una fibra de plidimetilsiloxano-divinilbenceno las cuales poseen las siguientes estructuras:



En la investigación evaluaron el tiempo de equilibrio, la fuerza iónica de las muestras durante el proceso de adsorción y los parámetros que afectan la desorción como la composición del solvente y el tiempo de desorción; todas las variables se optimizaron para obtener la mayor absorción y desorción de los compuestos fenolitos estudiados. Sus resultados arrojaron una mayor remoción por parte de la resina Carbowax aunque fue solo 16% el porcentaje de fenoles extraídos con esta fibra. El

limite de detección utilizando en detector UV estuvo en un rango de 1-10µg/L el cual es lo suficientemente bajo para determinar fenoles en aguas naturales. Las fibras estudiadas no representan una buena alternativa para la preconcentración de los fenoles para su posterior análisis por cromatografía líquida. [10]

Peñalver y col. (2002) realizaron un estudio similar al anterior probando unas fibras de poliacrilatos las cuales poseen la siguiente estructura:



El análisis se llevo a cabo probando los modos de análisis dinámico y estático, probando además la respuesta por parte de dos detectores un UV y el otro electroquímico. En ambos sistemas de detección en el modo de análisis estático obtuvieron una mayor recuperación de los fenoles en el proceso de desorción. Para la mayoría de fenoles los límites de detección son inferiores con el detector electroquímico (entre 50 y 100 veces). Se analizaron muestras reales en tiempos menores a 47min. [3]

En estudios posteriores se evaluaron diferentes fibras sintetizadas para preconcentrar fenoles para luego analizar los compuestos una vez desorbidos algunos por HPLC, otros por GC. Los estudios realizados utilizando SPE-GC incluyen un paso de derivación de los fenoles con anhídrido acético para convertir en compuestos más volátiles los fenoles para que estos puedan ser analizados por GC; los estudios en los cuales se mezclan las técnicas SPE con HPLC no incluyen el paso de derivación ya que para estos análisis los compuestos son estudiados en solución y su volatilización no es necesaria. Todos los compuestos desarrollados están enlazados a silica para

determinar la capacidad adsorptiva y su selectividad en los procesos de preconcentración, la posterior desorción y análisis de elementos que se encuentran a niveles de traza en la muestras problemas.

Olaecoechea (2005) estudió el comportamiento de una fibra de poliacrilatos como sorbente en el análisis de tres clorofenoles (DCP, TCP, PCP) mediante la Microextracción en Fase Sólida (SPME) acoplada a HPLC, optimizó los parámetros de adsorción, desorción y separación de los analitos tanto en la fibra como en la columna cromatográfica. El acoplamiento de las técnicas se realizó mediante una interfaz que permitió la automatización del proceso, encontrándose mejores resultados en los análisis realizados en modo estático para las condiciones optimizadas. [11]

Pocos son los trabajos realizados con alúminas modificadas con surfactantes en este campo como se propone es este estudio.

Asok Adak y colaboradores (2005) publicaron un trabajo en el cual hacen referencia a la alta capacidad de absorción de la alúmina modificada por surfactantes aniónicos en medio acuoso, detallan que al adsorber el surfactante dodecilsulfato de sodio (SDS) sobre la superficie de la alúmina, ésta desarrolla la capacidad de remover sustancias orgánicas en ambientes acuáticos a través de un proceso conocido como adsolubilización. Estudiando la cinética de remoción del fenol se encontró que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio fue de 1,5 h con una cinética de segundo orden. Los valores de pH con los cuales se obtiene una remoción de fenoles óptima son menores a siete (6,7 el pH óptimo), también se ve favorecida en la presencia de aniones y ligeramente favorecida cuando existen cationes en el medio, según sus resultados la variación de la temperatura en el rango comprendido entre 15°C y 35°C no afecta la remoción del fenol. En conclusión el estudio indicó que la alúmina modificada con surfactantes es altamente eficiente, obteniéndose alrededor de un 90% de remoción de fenol bajo condiciones óptimas, con la capacidad de ser reutilizada al

regenerarla con acetona o hidróxido de sodio para la desorción incluso del surfactante.[12]

Fajardo y col. (2007) sintetizaron esponjas cerámicas de alúminas modificadas con SDS con áreas superficiales superiores a los 182 m<sup>2</sup>/g obteniendo pérdidas de área menores al 14% respecto a la alúmina de partida. Los sólidos sintetizados ofrecen una resistencia mecánica adecuada, baja resistencia al flujo y alta porosidad, que son características necesarias para los procesos previstos. Las alúminas modificadas obtenidas poseen una capacidad de remoción de fenoles en medio acuoso superior al 90% y una mayor capacidad de tratamiento de aguas contaminadas que las alúminas comerciales

La presente investigación esta orientada hacia la búsqueda y evaluación de nuevos procedimientos de control ambiental, que permitan determinar de forma confiable compuestos específicos, como los fenoles, que se encuentran en los desechos de muchas actividades industriales, las cuales deben estar entre los límites máximos permitidos para la descarga en cuerpos acuosos dada su elevada toxicidad. Como el método de determinación de fenoles establecido es un procedimiento de determinación de fenoles totales y además tiene la limitación de no poder determinar compuestos fenólicos para-sustituídos donde la sustitución sea un grupo alquilo, arilo, nitro, benzoílo, nitroso o aldehído. La HPLC representa una alternativa para la determinación de una amplia gama de compuestos que no es posible determinar por otras técnicas, de allí su importancia como método de determinación de contaminantes aplicable al control ambiental. [13]

Adicionalmente se realizará una evaluación de un nuevo material desarrollado para preconcentrar y determinar fenoles en soluciones acuosas; la alúmina modificada con surfactantes, la cual cumple con la inquietud de estudiar noveles compuestos que posean la capacidad de adsorción. Estas alúminas según los estudios realizados por

Fajardo y colaboradores (2007) tienen una elevada capacidad de adsorción y desorción de fenoles, estos sólidos al ser desarrollados y sintetizados en el país ofrecen una opción efectiva y económicamente viable para la remoción de compuestos fenólicos que se encuentren como contaminantes de efluentes acuosos

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Diseñar un método analítico para la identificación y cuantificación de 11 fenoles considerados por la EPA como contaminantes prioritarios para su remoción por HPLC.

#### Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones de separación, detección y determinación de los fenoles por HPLC
- Evaluar los parámetros experimentales como el pH, la fuerza iónica, el flujo de muestra y de solvente que permitan la máxima remoción y una posterior desorción de los compuestos de interés por el sólido utilizado en el proceso de preconcentración.
- Determinar la capacidad de adsorción y la selectividad para la remoción de estos contaminantes por parte de la alúmina modificada en muestras acuosas reales.

## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En esta sección se presenta de forma detallada los pasos a seguir para poder cumplir con los objetivos planeados en el trabajo especial de grado

### 4.1. Determinación de los 11 fenoles EPA por HPLC

#### 4.1.1. Reactivos

➤ *Patrones*

Los fenoles de la marca comercial Chem Service fueron adquiridos en la distribuidora SCL Sistemas C. A. como una mezcla que contiene los 11 compuestos fenólicos en metanol según el método para determinación de contaminantes EPA-604 en el cual, 9 de los fenoles están en una concentración de 100 mg/L y los compuestos 2,4-DMP y 2-M-4,6-DNP están en una concentración de 1000 mg/L. Estos patrones vienen en ampollas de 1 mL.

Para la preparación de los patrones acuosos se utilizó agua desionizada (18 MΩ) con la finalidad de preparar patrones de concentraciones en mg/L de (20 y 200) – (1 y 10) – (0.7 y 7) – (0.5 y 5) – (0.3 y 3) – (0.1 y 1) – (0.05 y 0.5) – (0.03 y 0.3) – (0.01 y 0.1)

➤ *Fase Móvil*

Los solventes utilizados para la separación son:

Metanol Grado HPLC, de la casa Burdick & Jackson

Agua desionizada (18 MΩ) Nanopure de Barnstead. USA

Ácido Acético al 99.8% grado analítico.

La fase móvil se filtra a través de membrana de 0,5  $\mu\text{m}$  según sea la fase, a través de succión y luego son desgasificados en un baño de ultrasonido marca Cole-Palmer Instrumens, Co. Serie 8894.

#### 4.1.2. Instrumentación

➤ *Cromatógrafo*

Para la separación, determinación y cuantificación de los 11 fenoles a estudiar se utilizó el cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard modelo 1100 (hoy, Agilent Technologies) que esta constituido por cinco módulos:

a. Desgasificador: Este modulo permite eliminar los gases presentes en la fase móvil. Los solventes utilizados para cromatografía, deben ser desgasificados primero con ultrasonido, antes de ser introducidos en este módulo.



Figura 7. Desgasificador HP serie 1100

b. Bomba cuaternaria: permite cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Tiene la capacidad de eluir cuatro tipos de solventes diferentes, además de proporcionar un flujo entre 0.001-5mL/min y generar una presión máxima de 400 bar.



Figura 8. Bomba cuaternaria HP serie 1100

c. Automuestreador: El proceso de inyección es automatizado. Está constituido por un lazo que posee una capacidad de 1-100 $\mu$ L y un contenedor de 100 portaviales.



Figura 9. Automuestreador HP serie 1100 con contenedor de 100 portaviales

d. Sección de la columna: Este módulo se encuentra termostaticado por efecto Peltier con temperaturas que van desde  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta  $80^{\circ}\text{C}$ , además de poseer 3 compartimientos que permiten colocar varias columnas a la vez.



Figura 10. Sección de columna cromatógrafo HP serie 1100

e. Detector UV con arreglo de diodos: es un detector espectrofotométrico de ultravioleta que permite recolectar los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo. De esta manera los datos espectrales para cada pico se pueden recoger y almacenar a medida que van saliendo de la columna. Una de las formas de presentación de los datos espectrales que resulta útil para verificar la pureza del pico consiste en un grafico tridimensional ( $t, \lambda, A$ ).

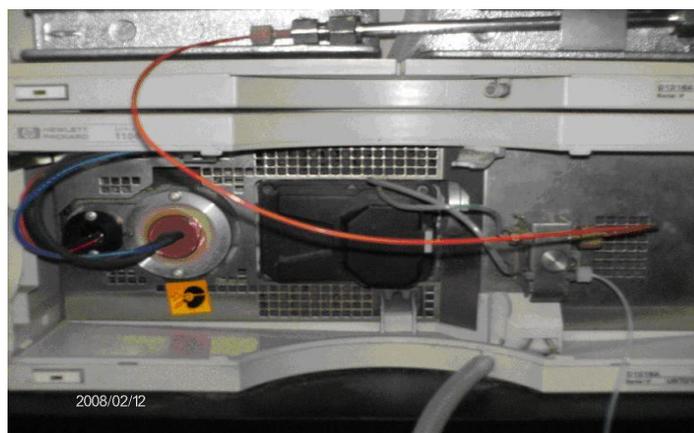


Figura 11. Detector UV/VIS HP serie 1100



La optimización de las condiciones de separación y determinación de los 11 fenoles se realizó partiendo de condiciones consultadas en trabajos previos entre los cuales se encuentran los siguientes:

Tabla 2. Datos de investigaciones anteriores utilizados en la optimización de la separación

Antecedentes	Fenoles estudiados	Parámetros del análisis
<p>Gonzalez-Toledo y col. (2001)</p> <p>Realizaron un estudio utilizando SPME acoplado a HPLC para analizar compuestos fenólicos en soluciones acuosas</p>	<p>Fenol</p> <p>4-nitrofenol</p> <p>2-nitrofenol</p> <p>2,4- dimetilfenol</p> <p>4-cloro-3-metilfenol</p> <p>2-clorofenol</p> <p>2,4-diclorofenol</p> <p>2,4,6-triclorofenol</p> <p>Pentaclorofenol</p>	<p>Columna: Hipersil (150x4,6mm, 5µm)</p> <p>Fase movil: agua/acetoniitrilo ambos con 1% de Acido Acético</p> <p>Gradiente: 70/30 por 7 min, seguido de un gradiente de elusión hasta 30/70 en 3 min, manteniendo la relación 5 min</p> <p>Flujo: 1 mL/min</p> <p>Temperatura 35°C</p> <p>λ: 268, 311, 278 y 302 nm</p>
<p>Peñalver y col. (2002)</p> <p>Determinaron compuestos fenólicos en muestras acuosas usando SPME acoplada a HPLC</p>	<p>Determinaron los 11 fenoles considerados por la EPA como contaminantes de remoción prioritaria</p>	<p>Columna: ODS-2 (25x0.4 cm, 5 µm)</p> <p>Fase movil: agua/metanol ambos con 1% AcOH</p> <p>Flujo: 1 mL/min</p> <p>Gradiente: t=0 75/25 t=25 50/50 y 100%</p>

		metanol a los 30 min Temperatura 65°C $\lambda$ : 280 y 302 nm
Liu y col. (2007) Utilizaron una fibra de SPME para determinar fenoles en muestras acuosas y analizaron estos compuestos por HPLC	Fenol 2-nitrofenol 4-nitrofenol 2,4-dinitrofenol 2,4-diclorofenol 2,4 dimetilfenol 2,4,6-triclorofenol	Columna: Hanbon C18 (250x4.5 mm, 5 $\mu$ m) Fase móvil: agua/acetonitrilo ambos con 1% de Acido Acético Gradiente: t= 0-5min 80/20, t = 20 min 20/80 t =25 min 10/90 parada t=26 min Flujo 1 mL/min $\lambda$ : 268, 311 y 280 nm

#### 4.2. Determinación de las figuras de mérito

Utilizando las condiciones encontradas en la etapa de optimización del método de separación se evalúan las siguientes figuras de mérito: limite de detección y limite de cuantificación de todos los fenoles presentes en el patrón multielemental

La determinación del limite de detección y de cuantificación se realizó mediante el método recomendado en el libro Estadística y Quimiometría para Química Analítica Miller & Miller en el cual se usa la curva de calibración y el error típico de la regresión para este cálculo

Adicionalmente al análisis cromatográfico se realizan ensayos con alúminas modificadas con surfactantes con la finalidad de realizar una preconcentración de los fenoles antes de su determinación por HPLC. A continuación se describe el proceso de modificación de la alúmina y las experiencias posteriores realizadas con la misma utilizando la técnica de Extracción en Fase Sólida (SPE)

### **4.3. Modificación de la alúmina**

#### **4.3.1. Reactivos**

Los reactivos utilizados para el procedimiento de modificación de la alúmina fueron:

Alúmina Comercial

Cloruro de Sodio sólido, al 99.8% de la casa comercial Riedel – de Haën

Dodecilsulfato de Sodio (SDS) al 95% de la casa Scharlau

Acido Clorhídrico al 37% de la casa Riedel – de Haën

Agua destilada, del destilador Mega Pure System modelo MP – 3A de la casa Barnstead

#### **4.3.2. Materiales**

Beacker con capacidad para 400 mL

Plancha de agitación

La modificación se realizó colocando 10g de alúmina comercial; 0,18M de SDS; 0,75g de NaCl; 300 mL de agua destilada y ajustando el pH a 2 con HCl; en el recipiente y agitando la solución por un periodo de 48 horas.

Posterior a este tiempo se detiene la agitación de decanta la solución y se titula en surfactante remanente con el método de azul de metileno. Para esto se toman alícuota de 5 mL de la solución remanente y se enrasan a 250 mL con agua destilada. De estas soluciones se toman 5 mL; 5 mL de cloroformo y 5 mL de azul de metileno y se colocan en un cilindro con tapa para su titulación con Hyamine 1622 0,004M. El punto final de la titulación se alcanza cuando ambas capas de solventes toman la misma intensidad de color.

#### **4.4. Determinación de la adsorción de los fenoles por la alúmina modificada mediante SPE**

##### **4.4.1. Extracción en Fase sólida**

###### **4.4.1.1. Reactivos**

Para el estudio de la adsorción por la alúmina se utilizaron patrones individuales de 8 fenoles del patrón multielemental con los cuales se prepararon madres de 5000 ppm aproximadamente de cada uno en metanol y se prepararan mezclas acuosas de estos según la experiencia a realizar.

###### **4.4.1.2. Materiales**

Los cartuchos utilizados para este proceso fueron preparados en el laboratorio, utilizando para ello jeringas comerciales de uso habitual para la inyección de insulina.



Figura 14. Jeringas comerciales para insulina

El sólido utilizado para la preparación del relleno del cartucho fue tamizado a través de tamices marca U.S.A Standard Testing Sieve Series con tamaño de poro de 106 y 177 micrómetros para acotar el tamaño de partículas de la fase estacionaria y pesado con la finalidad de optimizar la cantidad necesaria para una preconcentración eficiente y con esto obtener análisis reproducibles. Tanto en la parte inferior como en la parte superior de los cartuchos se colocó papel de filtro como soporte para el sólido a empacar, para esto se recortó una superficie circular del papel de filtro del tamaño aproximado del lecho de las jeringas y se introdujo en las mismas con el émbolo que poseen cada una de ellas



Figura 15. Materiales para construcción de los cartuchos SPE

Con la finalidad de reducir el volumen muerto en cada cartucho se introdujo dentro de los mismos una manguera de silicón, quedando una vez finalizado de la siguiente forma:



Figura 16. Cartucho preparado en el laboratorio para realizar SPE

La determinación de la adsorción de los fenoles por la alúmina modificada se realizó de dos formas, dependiendo del volumen de solución a pasar por el cartucho para la adsorción.

La primera consistió en colocar jeringas en la parte superior del cartucho e impulsar con presión positiva con los émbolos de cada jeringa el volumen de solución necesario para la experiencia



Figura 17. Cartucho de SPE con jeringa para pruebas preliminares de adsorción de la alúmina

La segunda incluyó una bomba peristáltica para hacer pasar por el cartucho las soluciones utilizadas para la adsorción y para la posterior desorción de los analitos del cartucho se procedió de la forma anterior, colocando la jeringa en el cartucho y haciendo presión positiva.



Figura 18. Bomba peristáltica marca Gilson modelo miniplus 3 utilizada para la SPE

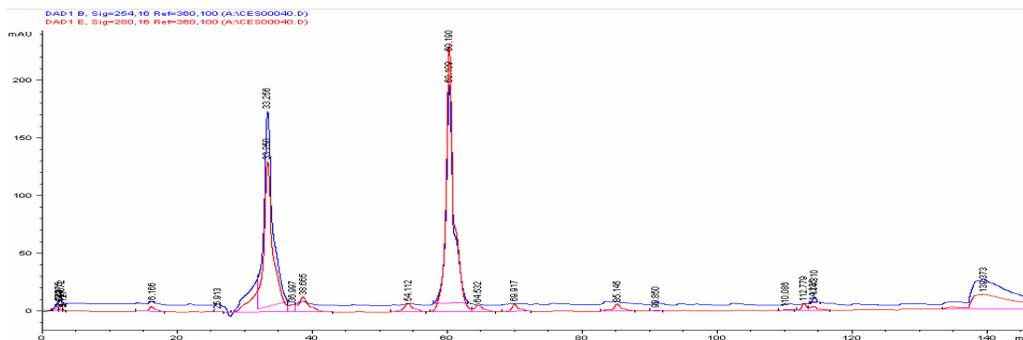
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Optimización de la separación cromatográfica de los fenoles considerados contaminantes de remoción prioritaria por la EPA

Tomando en cuenta las condiciones de separación cromatográfica reportadas en trabajos previos se utilizó como concentración de trabajo 20 mg/L para el fenol; 4-nitrofenol; 2-clorofenol; 2-nitrofenol; 2,4-dimetilfenol; 4-cloro-3-metilfenol; 2,4-diclorofenol; 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol; y 200mg/L para el 2,4-dinitrofenol y 3-C-4,6-dinitrofenol ya que estos últimos se encuentran 10 veces mas concentrados que los otros 9 compuestos del multipatrón. Para la búsqueda de las condiciones de separación se utilizaron los siguientes parámetros para el análisis inicial:

Volumen de inyección 25  $\mu$ L, flujo de fase móvil: 0,6 mL/min, temperatura de la columna 30  $^{\circ}$ C, detección: (254 y 280) nm

Con estas condiciones se procedió a realizar una corrida en la cual la relación de solventes se fue variando desde 90/10 agua/metanol hasta 100% metanol en aproximadamente 150 minutos para tener una estimación de las diferentes relaciones de solventes necesarias para una separación efectiva de los 11 compuestos fenólicos en el patrón.



Se observan 11 picos por lo que se procede a reducir el tiempo del gradiente de solventes con la finalidad de conseguir una separación efectiva en un tiempo menor.

Una vez obtenidos los datos de la corrida se procedió a programar un gradiente con la mayoría de las condiciones iniciales anteriores, solo se varió el flujo de fase móvil a 0,8mL/min para el siguiente análisis. El gradiente de solventes utilizado fue el siguiente:

Tabla 3. Primer gradiente de 50 minutos utilizado para la separación de fenoles

Tiempo (min)	Relación agua/metanol (%)
0 – 5	90/10
5 – 10	85/15
11 – 15	75/25
15 – 20	70/30
20 – 24	60/40
24 – 28	55/45
28 – 32	50/50
32 – 36	40/60
36 – 38	30/70
38 – 40	25/75
40 – 45	20/80
45 – 50	10/90

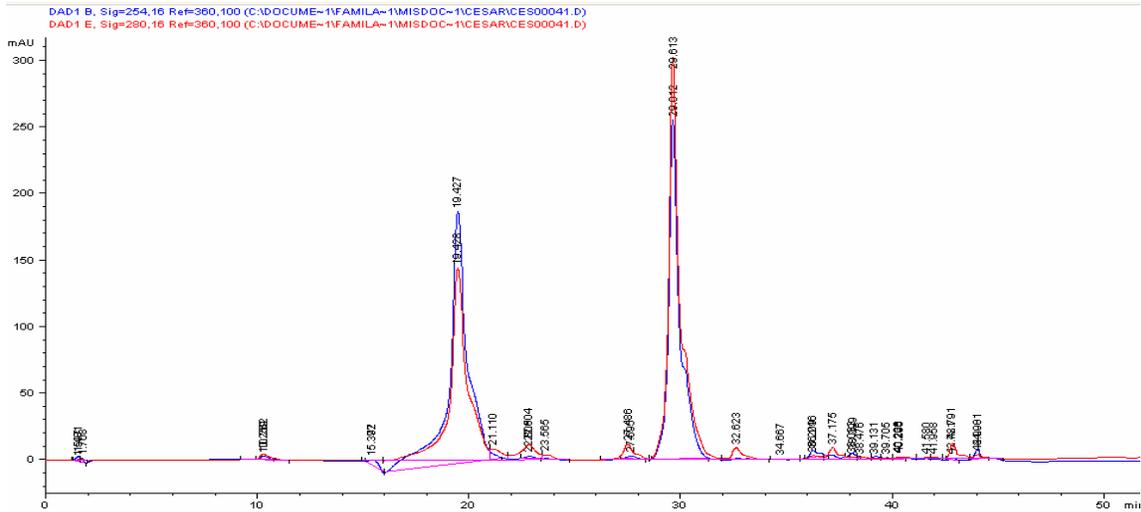


Figura 20. Cromatograma que muestra la separación de los fenoles con el gradiente mostrado en la tabla 3. Detectados a 254 y 280 nm

Se observan 10 picos en el cromatograma por lo que se propone un nuevo gradiente de solventes para separar los 11 compuestos.

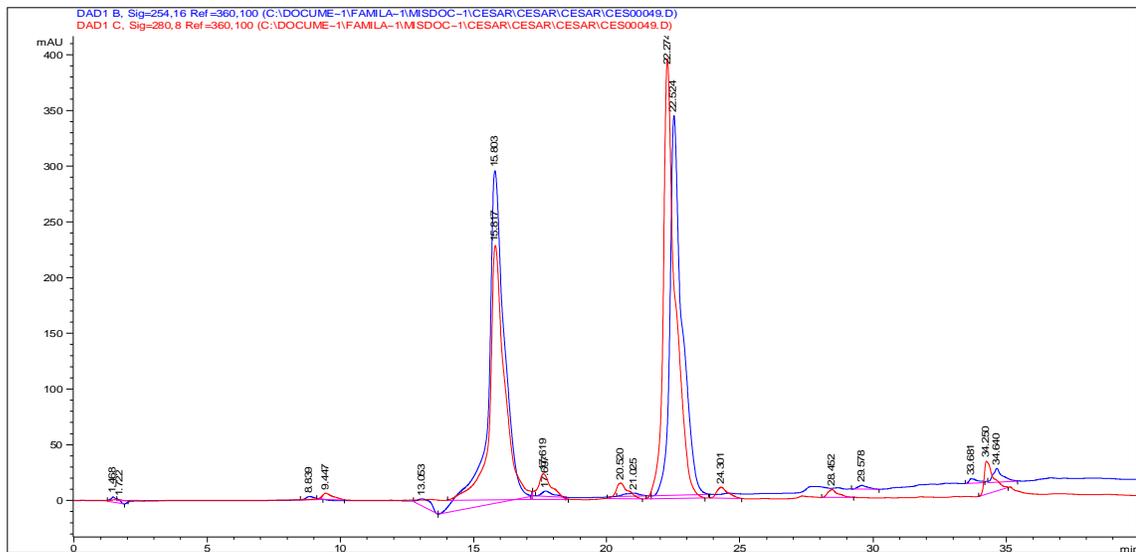
El volumen de inyección se varió como parámetro en la búsqueda de una mayor sensibilidad de los compuestos a analizar pero los dos compuestos que se encuentran en mayor concentración aumentan su señal de manera tal que saturan el detector por lo tanto se definió como volumen de inyección 25  $\mu$ L para los próximos análisis.

Se hicieron ensayos a diferentes programaciones del gradiente y se aumentó el flujo a 1 mL/min reduciendo el tiempo total de la corrida hasta los 40 minutos quedando la programación del gradiente de la siguiente forma:

Tabla 4. Gradiente a 1mL/min tiempo de parada 37 min

Tiempo (min)	Relación agua/metanol (%)
0	90/10
5	80/20
11	70/30
18	50/50
23	40/60
28	30/70
30	20/80
35	10/90

Con estas condiciones aun se observan 9 picos en el cromatograma

Figura 21 Disminución de los  $t_R$  al aumentar el flujo de fase móvil

Utilizando las experiencias de los trabajos anteriores a esta investigación se procedió a realizar un análisis con el mismo gradiente de solventes pero cambiando las

condiciones de detección de los fenoles. Para la experiencia siguiente se utilizaron las siguientes longitudes de onda para el análisis de los fenoles: (254, 268, 278, 302, 311) nm.

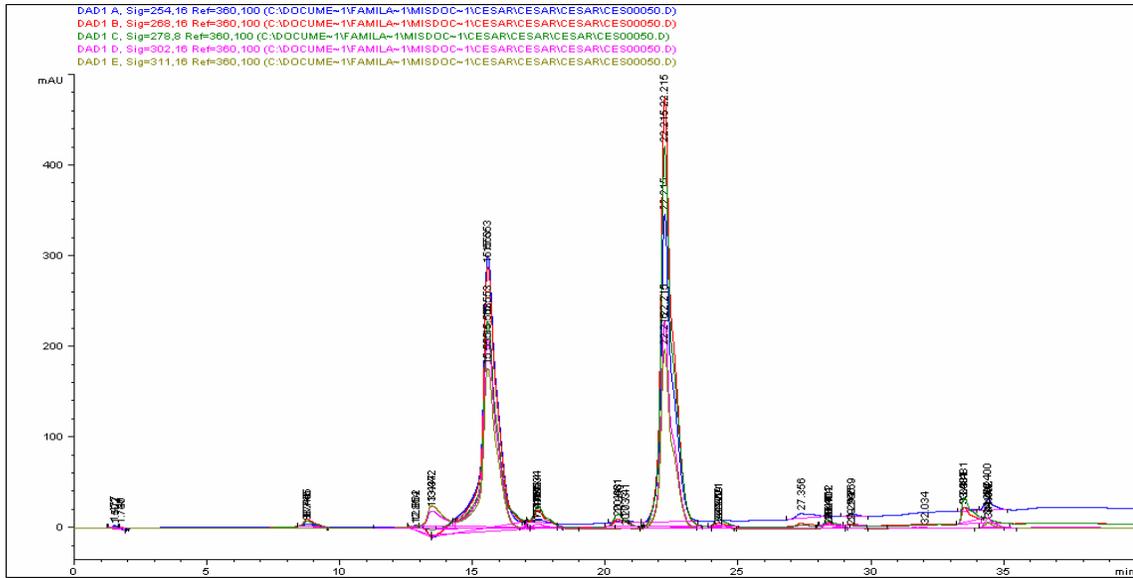


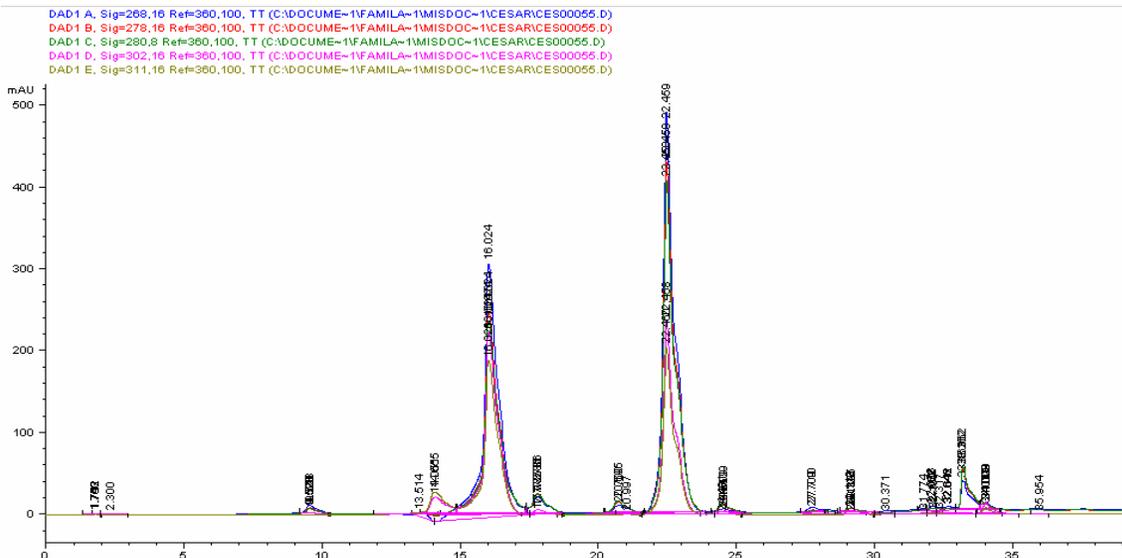
Figura 22. Cromatograma e el que se observan 2 picos a las nuevas  $\lambda$  de detección

En este cromatograma se observan picos a 302 y 311 nm que no se observaban en los análisis anteriores, es por esto que se incluyeron ambas longitudes de onda en las experiencias posteriores. También se descartó la detección a 254 nm debido a las múltiples interferencias observadas en los cromatogramas anteriores a esta longitud de onda

Se incluyó la  $\lambda = 280$  nm en los análisis posteriores y se varió el gradiente de forma tal de obtener una mejor separación, el gradiente que se probó fué el siguiente:

Tabla 5. Gradiente con las  $\lambda$  óptimas de detección

Tiempo (min)	Relación agua/metanol (%)
0	90/10
5	80/20
11	70/30
18	50/50
23	40/60
28	35/65
30	15/85
35	10/90

Figura 23. Cromatograma en el que se observan los compuestos a las  $\lambda$  óptimas de detección

Con este gradiente ya se observan 11 picos en el cromatograma, con los valores de las áreas obtenidas se decide no utilizar 278 nm como  $\lambda$  de detección para los compuestos debido a que a 280 nm los compuestos son mas sensibles y se ve la misma cantidad de picos.

Se modificó el gradiente aumentando la relación de metanol a tiempos inferiores como se muestra en la tabla

Tabla 6. Gradiente con aumento de relación de metanol a tiempos inferiores

Tiempo (min)	Relación agua/metanol (%)
0	80/20
3 – 5	70/30
8	60/40
11	50/50
15	40/60
18	25/75
20	20/80
21	15/85
23	15/85
25	10/90

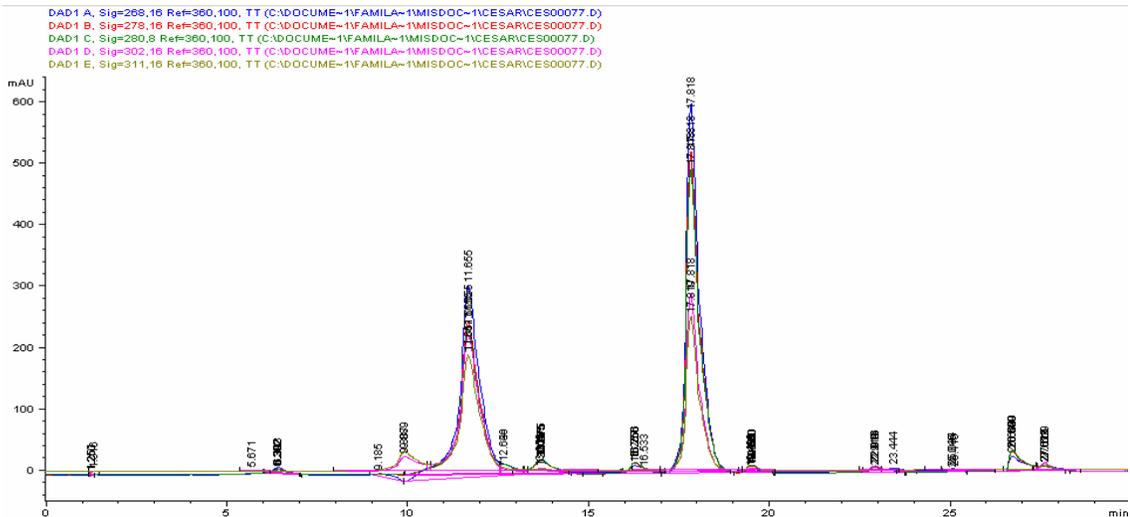


Figura 24. Separación de los fenoles con aumento de la relación de metanol en el gradiente a tiempos menores

Con este gradiente se disminuyó el tiempo de la corrida además de obtener picos con mayores áreas y alturas en el cromatograma

Luego de probar varios gradientes, los parámetros de separación óptima encontrados fueron:

Volumen de inyección 25  $\mu$ L, flujo de fase móvil 0,9 mL/min temperatura de la columna 30 °C, ambos solventes usados en la fase móvil poseían una concentración de ácido acético al 1 %. El gradiente de elución para la separación de los 11 fenoles fué el siguiente:

Tabla 7. Gradiente de separación óptima de los 11 fenoles

Tiempo (min)	Relación agua/metanol (%)
0 - 3	80/20
4 - 6	70/30
8	65/35
10	60/40
12	55/45
14	50/50
16	40/60
17	35/65
18 - 19	30/70
20	25/75
22	20/80
24	15/85
24.50	0/100

Adicionalmente a este gradiente, a los 26 minutos se colocaba 100% metanol sin ácido acético durante 4 minutos para lavar la columna, el tiempo de parada se

estableció a los 30 minutos, con 3 minutos para restablecer las condiciones iniciales. Los analitos fueron determinados a 268, 280, 302 y 311 nm

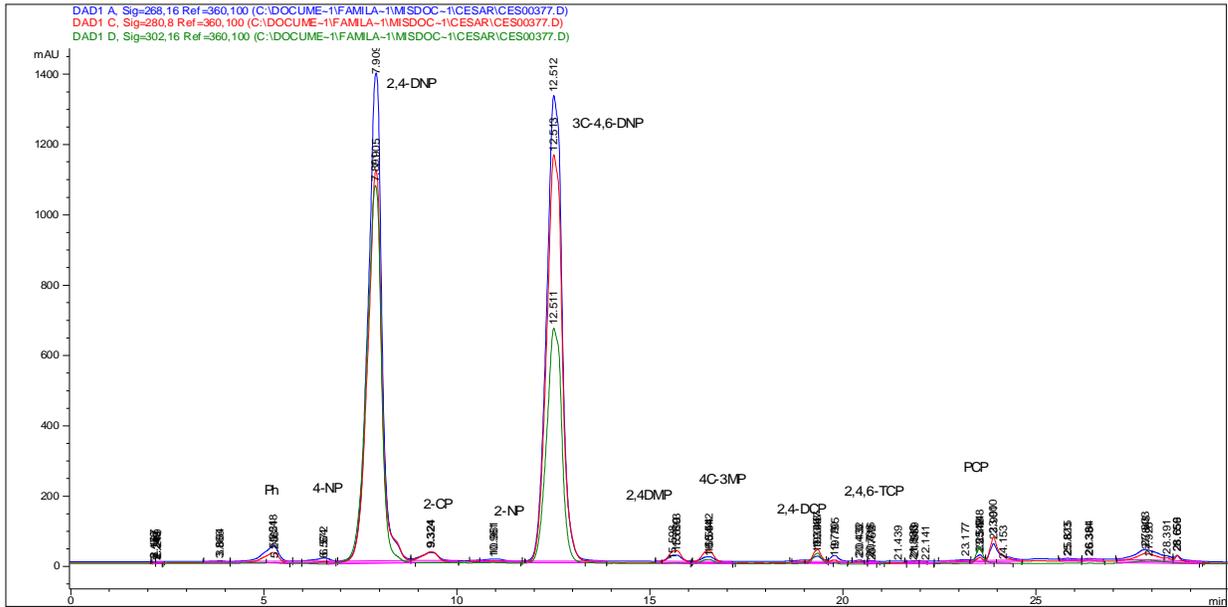


Figura 25. Cromatograma con las condiciones óptimas de separación

La identificación de los picos se logró, mediante la contaminación del multipatruon con patrones individuales para 8 de los fenoles en la muestra, los demás picos son señalados según referencias de su posición en los cromatogramas obtenidos en trabajos previos a esta investigación

Los solventes utilizados en la fase móvil fueron acidificados con la finalidad de desplazar el equilibrio entre el fenol y el fenolato hacia el primero, asegurando de esta forma que las concentraciones medidas de los fenoles corresponden a las mismos en su forma neutra. El gradiente de solventes utilizado en la investigación fue el que proporcionó la separación efectiva de los 11 componentes del patrón multielemental por lo que se procedió a realizar curvas de calibración y la determinación de los límites de detección para los patrones individuales presentes en el patrón multielemental.

## 5.2. Determinación de las figuras de mérito para la separación cromatográfica propuesta

Con las condiciones de separación óptima se procedió a realizar una serie de curvas de calibración con la finalidad de determinar las figuras de mérito para la separación propuesta. Para las curvas de calibración de los fenoles se prepararon patrones de concentraciones desde 0,1 ppm hasta 1 ppm; considerando que 2 de los fenoles en el multipatrn se encontraban 10 veces mas concentrados que los otros 9 fenoles para las curvas de calibración de estos 2 fenoles fue necesario diluir 10 veces los patrones utilizados para las curva de calibración de los demás patrones

Los valores de la pendiente de la curva, el coeficiente de correlación lineal, los límites de detección y cuantificación encontrados para cada fenol son mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 8. Figuras de merito.

Compuesto	Pendiente	R <sup>2</sup>	LOD*	LQD*
Ph	43.819	0.9842	0.14	0.42
4-NP	17.881	0.9450	0.40	1.07
2,4-DNP	98.643	0.9959	0.03	0.14
2-CP	93.601	0.9902	0.16	0.40
2-NP	41.932	0.9826	0.18	0.51
2,4-DMP	123.33	0.9924	0.02	0.22
2-M-4,6DNP	31.59	0.9951	0.07	0.24
4-C-3MP	29.375	0.9922	0.11	0.31
2,4-DCP	16.167	0.9897	0.43	1.22
2,4,6-TCP	11.478	0.9870	0.01	0.07
PCP	6.0273	0.9500	0.12	0.47

\* LOD y LQD expresados en mg/L

Existe un compromiso en la determinación de los compuestos individuales a partir del patrón multielemental como se aprecia en el coeficiente de correlación lineal de las curvas, ya que aunque para algunos de los fenoles los coeficientes son elevados

pero en el caso del 2-NP y PCP las regresiones tienen coeficientes bajos como se observan en la tabla. Debido a que los cambios en las condiciones de la separación cromatográfica pueden afectar varios compuestos del patrón, se utilizaron las condiciones que ofrecían una separación y determinación efectiva de todos los compuestos en contraposición de la linealidad de las curvas de calibración para algunos de los 11 compuestos fenólicos

Los límites de detección encontrados para todos los fenoles estudiados permiten la determinación de estos compuestos como contaminantes en muestras acuosas de efluentes o cuerpos de aguas en los que se sospeche la presencia de alguno de estos contaminantes como resultado del vertido de desechos; por lo que el método de separación cromatográfica es una herramienta alternativa que permite determinar compuestos que en el método estándar de determinación de fenoles totales no pueden ser medidos debido a que estos fenoles tienen grupos nitro y metilo en la posición *para* al grupo hidroxilo.

Adicionalmente los límites de cuantificación encontrados para el 2,4-DNP; 2,4-DMP; 2-M-4,6DNP; 4-C-3MP y 2,4,6-TCP están por debajo del límite máximo permitido, los límites de cuantificación del Ph; 2-CP y PCP se encuentran cercanos al límite máximo permitido de 0,5 mg/L para los fenoles que van a ser descargados en cuerpos acuosos por lo que aunque se pueden hacer determinaciones de estos contaminantes en dicho efluentes el nivel de contaminación de dichos compuestos puede ser medido solo cuando están cercanos al límite, aunque sus límites de detección permiten advertir la presencia de algunos de estos compuestos como contaminantes en concentraciones promedio por encima de los 0,15 mg/L

El límite de cuantificación para el 2-NP se encuentra ligeramente por encima del límite máximo permitido (0.51 mg/L) mientras que el 4-NP y el 2,4-DCP no pueden ser analizados en forma cuantitativa en muestras de aguas por esta técnica ya que sus

limites de cuantificación son elevados por lo que solo pueden ser cuantificados estos compuestos en efluentes con contaminaciones elevadas aunque se puede verificar la presencia de los mismos en los efluentes si su concentración esta ligeramente por debajo del limite máximo permitido ya que sus limites de detección son 0,40 y 0,43 mg/L respectivamente.

Cabe destacar que no se encontraron valores de LOD o LQD para la separación cromatográfica de los compuestos estudiados en trabajos previos, ya que en estos solo se incluyen los valores encontrados por acoplamiento de técnicas como la SPE o SPME con la HPLC, por los tanto no es posible hacer comparaciones de los valores obtenidos en esta investigación con valores reportados.

### **5.3 Estudio de un procedimiento de preconcentración de los fenoles considerados contaminantes de remoción prioritaria por la EPA**

Adicionalmente al estudio cromatográfico se realizó un procedimiento en el cual se estudió la adsorción y desorción de algunos de los fenoles considerados por la EPA como contaminantes de remoción prioritaria por una alúmina modificada con surfactantes, con la finalidad de realizar preconcentraciones de estos compuestos antes de su medición por HPLC y de esta forma poder determinar concentraciones inferiores a las determinadas por la técnica cromatográfica.

Para este estudio se procedió a modificar una alúmina con dodecilsulfato de sodio y luego se determinó la cantidad de surfactante adsorbido por la alúmina. Posteriormente se realizaron estudios de adsorción y desorción de los fenoles en el sólido modificado. Los resultados de estudios se presentan a continuación

### 5.3.1. Modificación de alúmina con dodecilsulfato de sodio

Una vez terminado el proceso de modificación se procede a verificar la adsorción del surfactante por la alúmina comercial. Se titula por triplicado la solución remanente con Hyamine 1622 0,004M según el método de azul de metileno. Los resultados de estas titulaciones se muestran en la tabla 9.

El peso medido de SDS fue 16,3917g lo que representa una concentración de 0,18M

Tabla 9. Resultados de la titulación del SDS por el método de azul de metileno

alicuota (ml)	V titulante	Conc final (M)	cant adsor	%ads
5	3,3	0,132	0,048	26,665
5	3,2	0,128	0,052	28,887
5	3,15	0,126	0,054	29,998
	promedio	0,129	0,051	29
	SD	0,003	0,003	2

Mediante la titulación se comprueba y determina la cantidad de surfactante adsorbido en la alúmina. El exceso de SDS garantiza que la alúmina quede saturada del surfactante y que por lo tanto tenga una mayor afinidad con compuestos menos polares que los solubles en agua que son los que principalmente adsorbe la alúmina sin modificar.

### 5.3.2. Extracción en Fase Sólida

Para el estudio de la adsorción y desorción de los fenoles por la alúmina modificada se procedió a preparar una solución con los 4 patrones individuales disponibles en el laboratorio los cuales eran: fenol, 2,4-diclorofenol; 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol y se realizaron una serie de experiencias como se muestra a continuación.

**5.3.2.1. Estudio de la adsorción y desorción del fenol; 2,4-diclorofenol (DCP); 2,4,6-triclorofenol (TCP); y pentaclorofenol (PCP) por la alúmina modificada.**

a) El primer experimento consistió en probar la adsorción y la desorción del fenol (Ph), diclorofenol (DCP), triclorofenol (TCP) y pentaclorofenol (PCP) colocando 0,2 g de la alúmina modificada en el cartucho y haciendo pasar por el cartucho 1 mL de una solución de concentración 2 ug/mL de cada fenol. Se evaluaron 5 cartuchos y cada uno fue lavado con volúmenes diferentes de metanol con la finalidad de obtener el volumen de lavado ideal. Los resultados fueron los siguientes:

- La absorción de los compuestos fue

Tabla 10. Adsorción del Ph, DCP, TCP y PCP

Compuesto	Promedio(ug)	SD	%ads
Ph	0,63	0,09	32.1
DCP	1,9	0,1	100.0
TCP	2.	0	100.0
PCP	2.	0	100.0
total	6,5	0,2	83.0

El fenol es el analito que es adsorbido en menor cantidad por la alúmina debido a que es el más polar y por lo tanto presenta menor afinidad con los sitios activos disponibles del dodecilsulfato de sodio unido al sólido. La absorción de 32% de fenol contrasta con la adsorción en su totalidad de los clorofenoles, ya que estos al ser menos polares presentan mayor interacción con los sitios activos disponibles para la adsorción.

- La desorción varió según el volumen añadido de la siguiente forma:

Tabla 11. Evaluación de la desorción de Ph, DCP, TCP, PCP con diferentes volúmenes de desorción

Compuesto	masa adsorbida (ug)	vol añadido (mL)	masa recuperada (ug)	%rec
Ph	0,64	0,25	0,73	114
	0,52	0,50	0,41	78
	0,56	1,00	0,62	111
	0,70	2,00	1,22	174
	0,74	4,00	0,00	0
DCP	2,00	0,25	1,54	77
	1,76	0,50	0,58	33
	1,73	1,00	2,07	120
	2,00	2,00	3,08	154
	2,00	4,00	0,00	0
TCP	2,00	0,25	1,51	76
	2,00	0,50	0,95	48
	2,00	1,00	1,78	89
	2,00	2,00	2,12	106
	2,00	4,00	0,00	0
PCP	2,00	0,25	1,31	66
	2,00	0,50	1,13	56
	2,00	1,00	1,47	74
	2,00	2,00	2,60	130
	2,00	4,00	0,00	0

Con la excepción de la desorción con 0,5 mL de metanol la cantidad de masa recuperada medida aumentó con el volumen de desorción hasta los 2 mL. Al desorber con 4 mL de metanol no se observa señal de los analitos en el equipo debido a que se encuentran diluidos hasta valores no cuantificables. (Ver grafico 1)

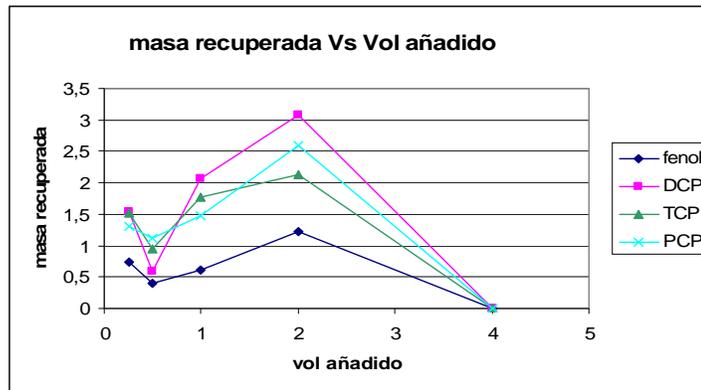


Grafico 1. Masa recuperada vs. Volumen de desorción

b) La experiencia fue realizada de nuevo duplicando la concentración de los analitos en la solución de partida obteniéndose los siguientes resultados:

- La absorción en este caso fue

Tabla 12. Adsorción de Ph, DCP, TCP, PCP solución de partida 4ppm

compuesto	Promedio (ug)	SD	%ads
Ph	1,3	0,4	33
DCP	3,6	0,5	90
TCP	3,6	0,6	91
PCP	3,9	0,3	97
total	12	2	78

La adsorción del fenol en este caso también fue la menor al igual que en la experiencia anterior aunque aumento 5% en promedio respecto a la primera experiencia. Por otro lado la adsorción de los otros compuestos no fue completa en varios casos lo que se puede explicar por la saturación de la alúmina, ya que presenta un número de centros activos definidos los cuales son ocupados en su totalidad. Es por esto que se escoge la concentración de 2 ppm como la concentración de trabajo para futuras experiencias.

➤ La recuperación también fue evaluada con diferentes volúmenes de desorción como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13. Recuperación de los contaminantes con diferentes volúmenes de desorción

Compuesto	Masa adsorbida (ug)	vol añadido (mL)	masa recuperada (ug)	%rec
Ph	1,96	0,25	0,998	51
	0,92	0,50	0,745	81
	1,20	1,00	--	0
	1,08	2,00	--	0
	1,44	4,00	--	0
DCP	4,00	0,25	2,488	62
	2,77	0,50	2,045	74
	3,58	1,00	2,050	57
	3,61	2,00	3,740	104
	4,00	4,00	2,240	56
TCP	4,00	0,25	2,750	69
	2,61	0,50	2,470	95
	3,56	1,00	2,730	77
	4,00	2,00	5,820	146
	4,00	4,00	5,320	133
PCP	4,00	0,25	2,580	64
	3,32	0,50	2,460	74
	4,00	1,00	2,590	65
	4,00	2,00	5,500	138
	4,00	4,00	4,000	100

El fenol es recuperado casi por completo con el primer volumen de 0,25 mL y disminuye su recuperación al aumentar el volumen de metanol. Los demás patrones presentan un comportamiento similar entre si, aumentando la cantidad recuperada al aumentar el volumen de desorción a excepción de la desorción con 1 mL de metanol en el cual se observa una disminución de la tendencia a mayor recuperación de masa de los analitos. Los valores de recuperación con 4 mL de metanol se pueden explicar por la dilución de los analitos recuperados lo que repercute en la concentración final medida como se observa en el grafico 2

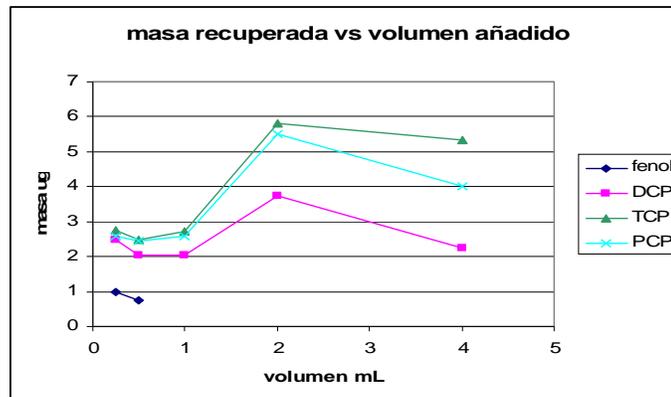


Grafico 2. Masa recuperada vs. Volumen añadido

c) Luego de estos experimentos se realizaron pruebas de la reproducibilidad de los análisis evaluando adsorciones y desorciones sucesivas en un cartucho. Se realizó por triplicado con volumen de inyección en el cartucho de 1ml de la solución de los 4 patrones de concentración 2ug/mL y dos lavados de 0,25 mL de metanol para la evaluación de la desorción.

- Los resultados de la adsorción son los siguientes:

Tabla 14. Reproducibilidad de la adsorción

compuesto	Promedio (ug)	SD	%ads
Ph	0,60	0,20	30.0
DCP	1,99	0,02	99.5
TCP	2,00	0.00	100.0
PCP	2,00	0.00	100.0
Total	6,6	0,2	82.5

El fenol es adsorbido en promedio 30% en las 3 experiencias, el DCP es adsorbido casi en su totalidad; el TCP y el PCP son adsorbidos por completo en la alúmina ya que no se observa señal en ninguna de las soluciones medidas a la salida del cartucho. Ver grafico 3

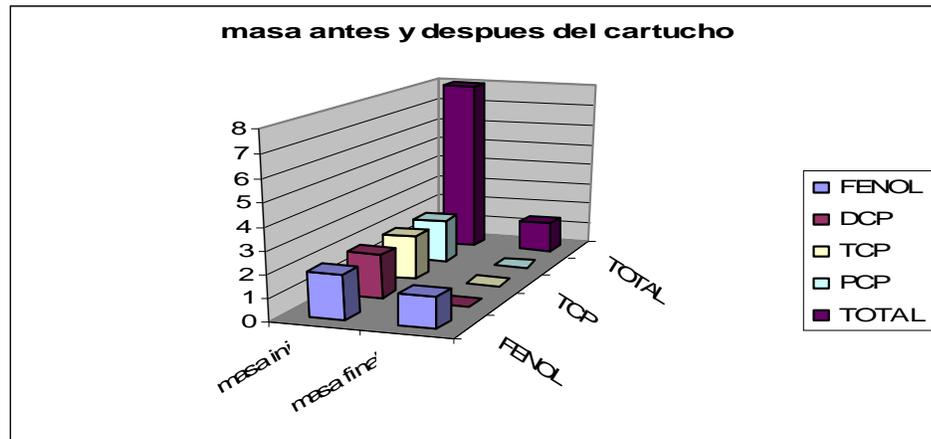


Gráfico 3. Solución inicial y masa medidas después de pasar la solución por el cartucho

Los resultados de esta experiencia son consistentes con los obtenidos en un principio para la evaluación de los cartuchos

- Para la desorción los resultados son mostrados como el promedio de las tres primeras recuperaciones con 0,25 ml de metanol y su desviación estándar, el promedio de las segundas recuperaciones con 0,25mL de metanol y su desviación estándar y el total de masa recuperada al sumar los resultados de ambas recuperaciones:

Tabla 15. Reproducibilidad de la desorción

compuesto	prom 1º lav	SD	prom 2º lav	SD	Total	SD
Ph	0,58	0,05	0	0	0,58	0,05
DCP	1,3	0,1	0,19	0,1	1,51	0,25
TCP	1,4	0,2	0,16	0,04	1,59	0,22
PCP	0,95	0,09	0,31	0,09	1,26	0,17
Total	4,3	0,3	0,66	0,2	4,94	0,49

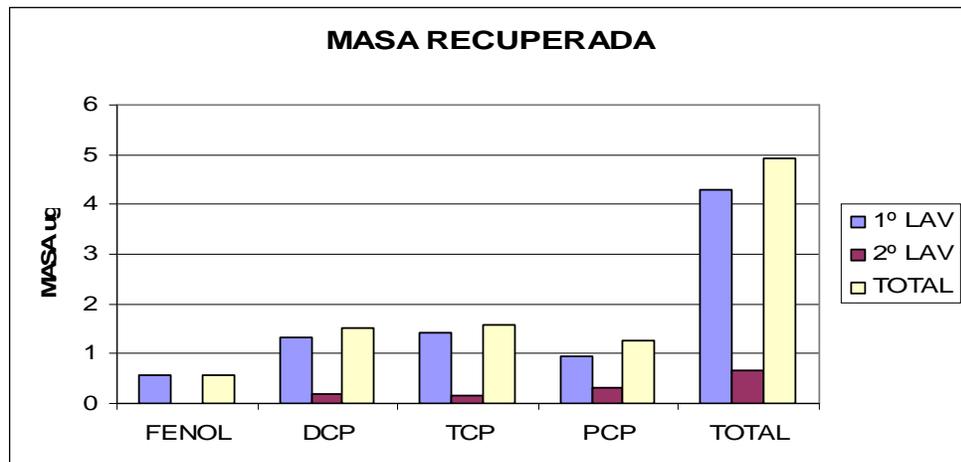


Grafico 4. Masa recuperada en las desorciones y sumatoria de la masa recuperada

Los resultados muestran que el fenol adsorbido puede ser recuperado en su totalidad en el primer lavado, pero con solo 2 lavados de 0,25 mL de metanol no es posible recuperar la totalidad de los otros analitos adsorbidos en la superficie del sólido.

### 5.3.2.2. Estudio de la adsorción del fenol en el cartucho de SPE

El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad de adsorción del fenol por la alúmina modificada, ya que en los estudios anteriores los resultados obtenidos despertaron el interés de evaluar si la baja adsorción del fenol por la alúmina se debe a la saturación de la misma por los clorofenoles o se debe a una baja afinidad de la alúmina hacia el fenol

Para esto estudio se duplicó la masa de alúmina modificada utilizada hasta entonces. Se fijó la masa de alúmina en 0,4g y se pasó por el cartucho una solución que contenía 2 ug/mL de fenol.

- De los 2 ug que se hicieron pasar por el cartucho 1,48 ug fueron adsorbidos, lo que representa el 74% de la masa del analito.

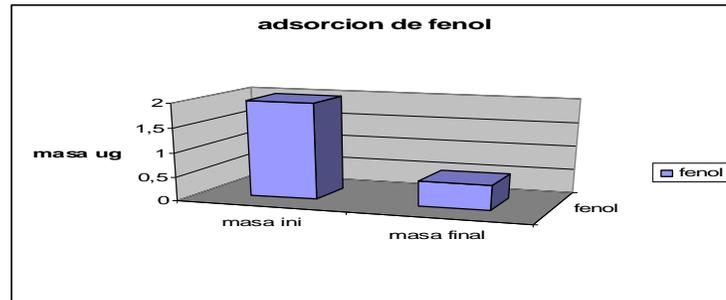


Gráfico 5. Masa inicial de fenol y masa medida después del cartucho

El aumento de la cantidad de fenol adsorbido en este caso no solo se debe al aumento de la masa de adsorbente colocada en el cartucho, también se debe a la presencia del fenol como único analito en la solución estudiada ya que a ser el único compuesto afín con la alúmina modificada dispone de una mayor cantidad de sitios activos para su adsorción.

Otro resultado a destacar en este experimento, es que al duplicar la masa de alúmina y colocar al fenol como único analito en la solución no se logró una adsorción del 100% del fenol por lo tanto se infiere que la polaridad de este es un factor importante al momento de analizar su afinidad con la alúmina modificada y la adsorción del mismo en presencia de compuestos fenólicos menos polares como los clorofenoles; ya que el compuesto no es afín del todo con la alúmina y al momento de estar en presencia de compuestos menos polares es de esperar el comportamiento que se observó en los experimentos anteriores en los cuales la adsorción del fenol estuvo entre un 26 y un 30% mientras que los clorofenoles estuvo cercana al 100%

- La desorción se evaluó con lavados sucesivos de 0,25 mL de metanol obteniéndose como volumen de recuperación 1 mL aunque en el cuarto lavado no es

posible cuantificar el analito en el equipo se observa la presencia del pico del mismo en el cromatograma, ya en el tercer lavado se obtiene una recuperación de casi el 100% del analito.

El aumento en el volumen de desorción se debe al aumento de la masa de analito adsorbida en el cartucho por lo que se necesita mayor cantidad de solvente para extraer todo el fenol del cartucho.

### 5.3.2.3. Evaluación del volumen ideal de desorción

Utilizando el cartucho de masa de adsorbente 0,4g se realizó una experiencia que consistió en medir el comportamiento de la solución de 2ug/mL de los 4 patrones en agua en el cartucho y la posterior desorción con 8 lavados sucesivos de 0,25 mL de metanol para la obtención del volumen ideal de desorción.

- Los resultados de la adsorción fueron:

Tabla 16. Adsorción de los fenoles en el cartucho de 0,4g de masa de adsorbente

Compuesto	masa inicial	masa final	%ads
Ph	2	0,69	65.5
DCP	2	0,00	100.0
TCP	2	0,00	100.0
PCP	2	0,00	100.0
TOTAL	8	0,69	91.4

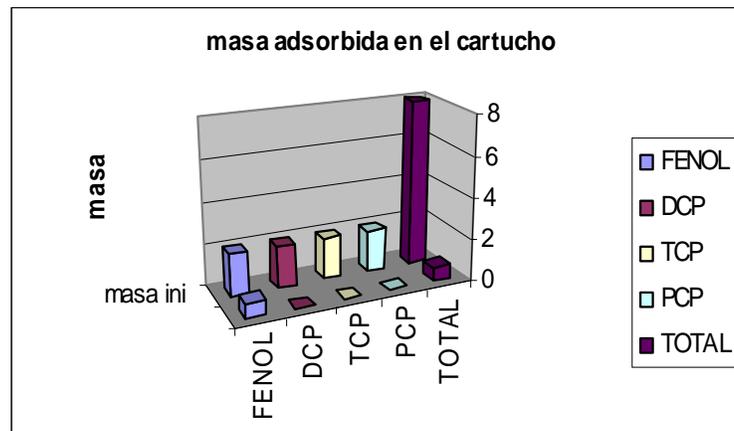


Gráfico 6. Masa adsorbida en el cartucho de 0,4g de masa de adsorbente

La adsorción del fenol en este caso fue de 66% debido a que la masa de adsorbente es 0,4g y no 0,2g como en los experimentos anteriores que incluían también a los clorofenoles. Los clorofenoles fueron adsorbidos por completo en el cartucho

➤ Cada volumen de metanol utilizado para los lavados fue recogido por separado luego de pasar por el cartucho y analizado en el cromatógrafo. Los resultados se presentan a continuación:

Tabla 17. Masas recuperadas en las diferentes desorciones

compuesto	masa recuperada en los lavados (ug)					
	1º lav	2º lav	3º lav	4º lav	5º lav	6º lav
Ph	1,02	0,43	0,08	0	0	0
DCP	0,97	0,56	0,23	0,06	*	*
TCP	1,04	0,64	0,27	0,17	*	*
PCP	0,55	0,56	0,38	0,25	*	*
Total	3,88	2,49	0,96	0,48	*	*

En las dos primeras desorciones se obtienen los valores de recuperación más altos, disminuyendo estos a medida que aumenta el número de lavados.

El fenol es recuperado por completo con 3 lavados, la masa de los clorofenoles puede ser medida hasta el 4º lavado, en los lavados 5 y 6 se observan los picos en los

tiempos correspondientes a estos analitos pero debido a su concentración no pueden ser cuantificados en el equipo, es por esto que en los espacios a los cuales corresponden los valores de masa recuperada en el 5<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup> lavados son colocados unos asteriscos. Grafico 4

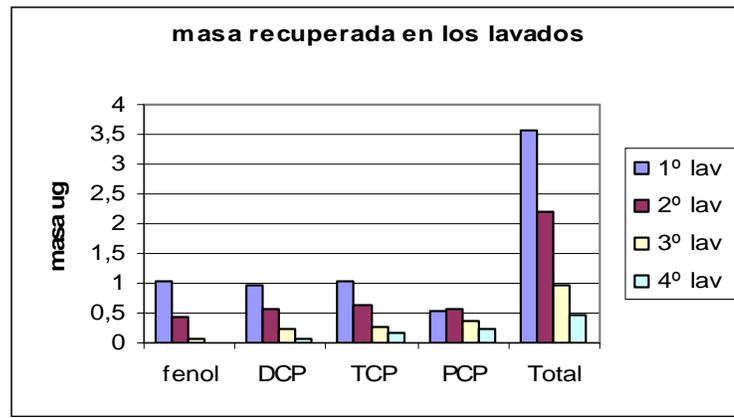


Grafico 7. Masa recuperada en las desorciones sucesivas

En cuanto al total de masa recuperada en el proceso de desorción los resultados obtenidos fueron:

Tabla 18. Comparación adsorción - total recuperado

Compuesto	total ads	total rec
fenol	1,31	1,53
DCP	2,00	1,82
TCP	2,00	2,12
PCP	2,00	1,74
total	7,31	7,21

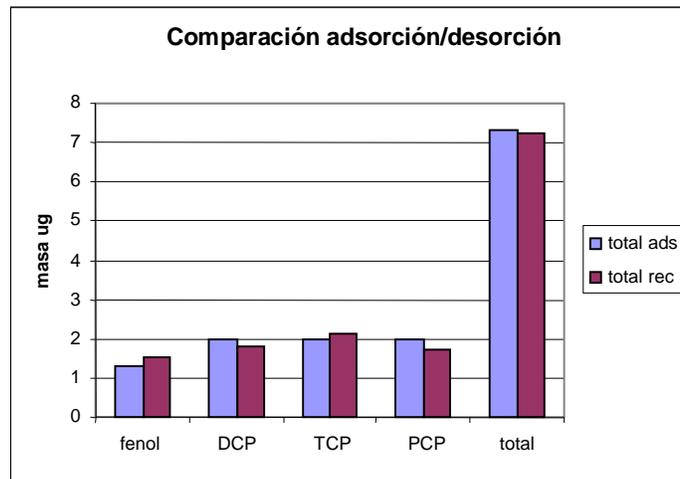


Gráfico 8. Comparación adsorción - desorción

Para el DCP y PCP con 4 desorciones solo se recupera el 90% de la masa adsorbida. Aunque el valor de masa recuperada fue medida en las 4 primeras desorciones el volumen de desorción total es aproximadamente 1,5 mL ya que se observan picos con presencia de analitos hasta estos lavados aunque no es posible cuantificarlos.

#### 5.3.2.4 Influencia del pH en la adsorción

El mismo cartucho usado en la experiencia anterior se utilizó para medir el comportamiento de una solución de 2ug/mL de los 4 patrones con 1% de ácido acético con la finalidad de determinar la influencia del medio ácido en el proceso de adsorción del cartucho; la desorción también se realizó con 8 lavados sucesivos con 0,25 mL de metanol

- Evaluando la adsorción de la solución de 2ug/mL de los 4 fenoles con 1% de ácido acético los resultados son:

Tabla 19. Evaluación de la adsorción con pH ácido

Compuesto	masa inicial	masa final	% ads
Ph	2	0,48	76
DCP	2	0,00	100
TCP	2	0,00	100
PCP	2	0,00	100
TOTAL	8	0,48	94

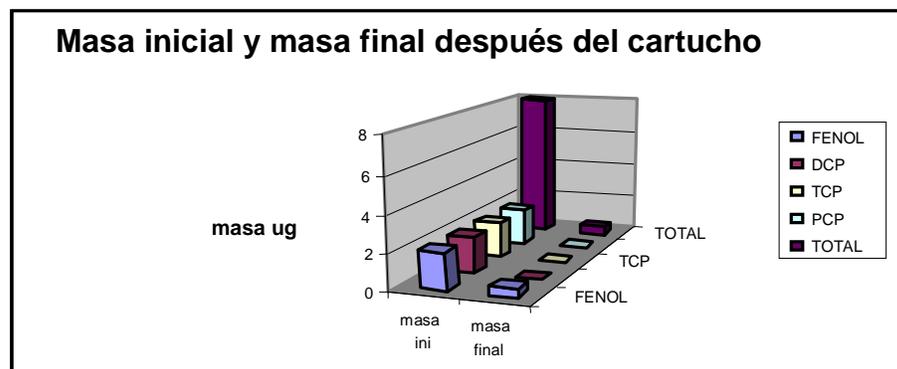


Gráfico 9. Adsorción de los patrones a pH ácido

La adsorción del fenol presenta un aumento del 10% respecto a la adsorción de la solución sin ácido acético, los clorofenoles son adsorbidos en su totalidad al igual que en la prueba anterior.

➤ La desorción fue evaluada igual al procedimiento anterior, cada volumen de metanol utilizado para los lavados fue recogido por separado luego de pasar por el cartucho y analizado en el cromatógrafo.

Tabla 20. Evaluación de la desorción

compuesto	masa recuperada en las desorciones					
	1º lav	2º lav	3º lav	4º lav	5º lav	6º lav
Ph	0,83	0,29	0,09	0,08	*	*
DCP	0,89	0,61	0,29	0,01	*	*
TCP	0,80	0,68	0,19	0,23	*	*
PCP	0,58	0,56	0,05	0,26	0,23	0,18
Total	3,10	2,14	0,62	0,58	0,23	0,18

Los resultados de la desorción son similares a los obtenidos en la experiencia anterior con la recuperación de masa adsorbida en mayor cantidad en los 2 primeros lavados, con la diferencia que el fenol es recuperado en su totalidad en 4 lavados y el PCP puede cuantificarse hasta el 6º lavado

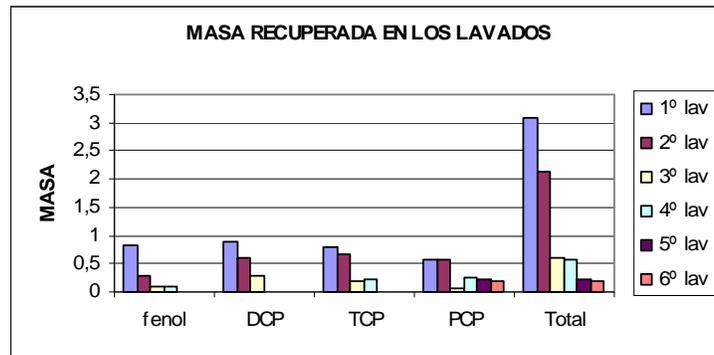


Grafico 10. Evaluación de la masa recuperada a medida que aumentan las desorciones

Se puede apreciar que se obtiene una mayor recuperación en el primer lavado y como esta disminuye al aumentar el número de lavados

En cuanto al total de masa recuperada en el proceso de desorción los resultados obtenidos fueron:

Tabla 21. Comparación masa adsorbida masa total recuperada

Compuesto	total ads	total rec
fenol	1,51	1,29
DCP	2,00	1,80
TCP	2,00	1,90
PCP	2,00	1,86
total	7,51	6,85

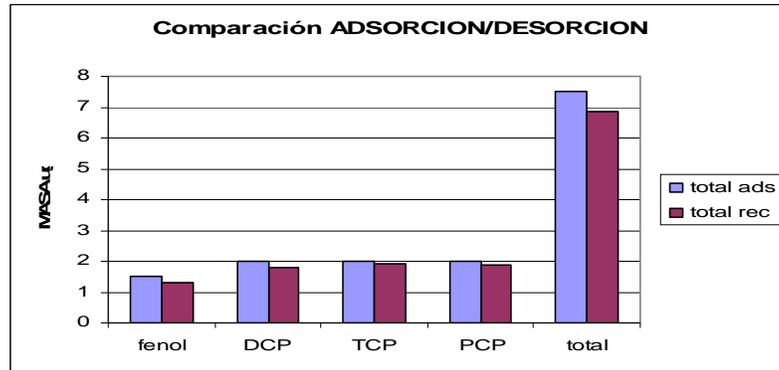


Grafico 11. Comparación de la masa adsorbida y la masa total recuperada

El total de masa recuperada medida fue inferior 14% a la masa recuperada del cartucho en la experiencia anterior

Comparando los resultados de adsorción de ambos procesos se tiene que el medio ácido aumenta la adsorción del fenol en el cartucho pero en contraposición la desorción es menor para los compuestos presentes en la solución ácida.

### 5.3.2.7. Evaluación de la adsorción y desorción de 4-nitrofenol (4-NP); 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP); 2-nitrofenol (2-NP) y 2,4-dimetilfenol (2-DMP).

Una vez finalizados los estudios de adsorción y desorción del fenol y los clorofenoles; estuvieron disponibles 4 patrones individuales de otros fenoles considerados como contaminantes de remoción prioritaria por la EPA incluidos en la separación cromatográfica. Al ser estos nitrofenoles y metilfenoles se procedió al estudio por separado de este grupo de compuestos antes de realizar las experiencias con los 8 patrones individuales disponibles en ese momento en el laboratorio.

Utilizando el cartucho de 0,2g se pasó 1 mL de una solución de 2 $\mu$ g/mL de 4-nitrofenol (4-NP); 2,4- dinitrofenol (2,4-DNP); 2-nitrofenol (2-NP) y 2,4-dimetilfenol (2-DMP); y se desorbió con 5 lavados de 0,25 mL de metanol.

➤ Los resultados de la adsorción son los siguientes:

Tabla 22. Adsorción de los 4 patrones evaluados en esta experiencia

Compuesto	masa inicial	masa final	% ads
4-NP	2	1,17	41.5
2,4-DNP	2	0,78	61.0
2-NP	2	0,92	54.0
2,4-DMP	2	1,01	49.5
TOTAL	8	3,88	51.5

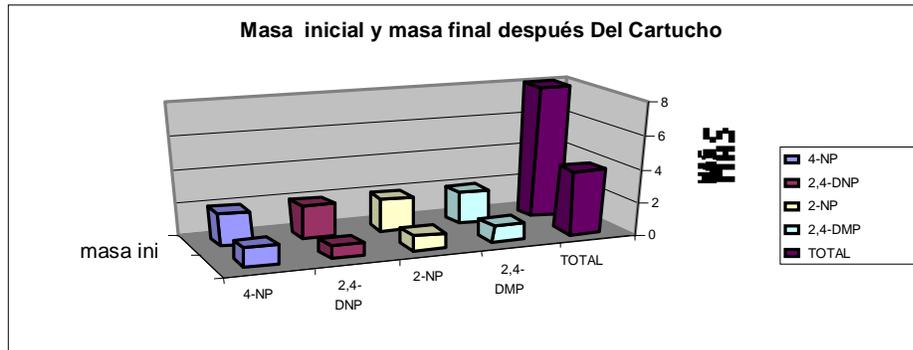


Gráfico 12. Comparación de la masa inicial y la masa final medida después del cartucho

Ninguno de los patrones de la solución fue adsorbido por completo, el analito con mayor adsorción fue el 2,4-DNP con 61% de la masa inicial adsorbida seguido del 2-NP 54%, el DMP 50% y el 4-NP 42%.

El comportamiento de este grupo fue similar al fenol que es el compuesto más polar de la serie anterior, lo que indica que la polaridad es un factor determinante en la adsorción de los analitos en el cartucho.

El fenol que es el compuesto mas polar es adsorbido en promedio 30% y a medida que la polaridad va disminuyendo aumenta la adsorción en el cartucho con la excepción del 2,4-DNP

- Los resultados de la masa recuperada en las desorciones del cartucho son:

Tabla 23. Evaluación de la desorción de los patrones en el cartucho

Compuesto	masa recuperada en las desorciones				
	1º lav	2º lav	3º lav	4º lav	5º lav
4-NP	0,72	0,30	0,10	0,05	0,01
2,4-DNP	0,87	0,18	0,00	0,00	0,00
2-NP	0,50	0,21	0,14	0,00	0,00
2,4-DMP	0,86	0,41	0,01	0,00	0,00
Total	2,95	1,10	0,25	0,05	0,01

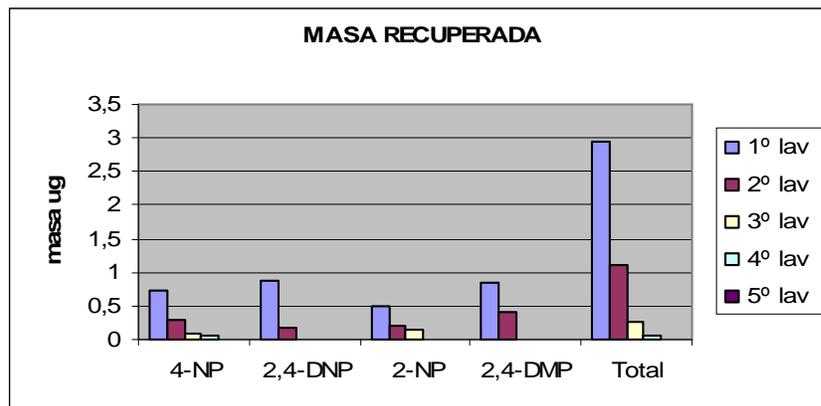


Gráfico 13. Evaluación de la masa recuperada a medida que aumentan las desorciones

Aunque los analitos no fueron adsorbidos por completo en el cartucho la masa medida en la recuperación del 2,4-DNP y 2-NP no fue el 100% contrastando con la recuperación del 4-NP y el 2,4-DMP que fueron recuperados en su totalidad.

Tabla 24. Masa absorbida vs masa total recuperada

Compuesto	adsorción	total rec
4-NP	0,83	1,19
2,4-DNP	1,22	1,05
2-NP	1,08	0,85
2,4DMP	0,99	1,29
total	4,12	4,38

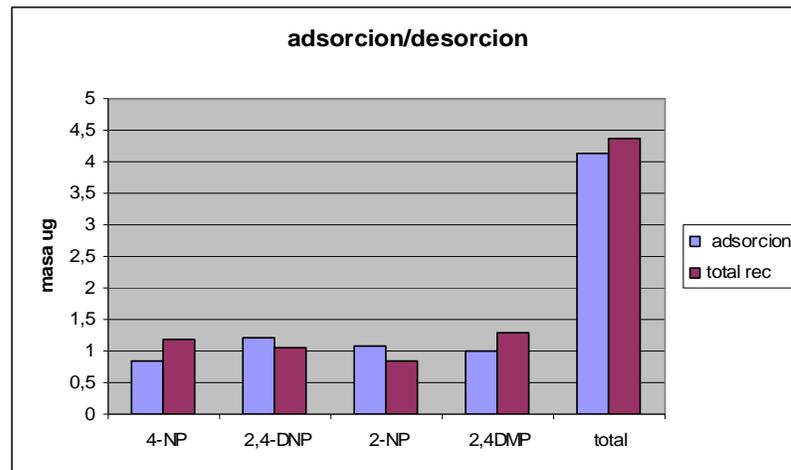


Grafico 14. Masa adsorbida vs. masa total recuperada

### 5.3.2.6. Estudio de la adsorción y desorción de los 8 patrones Ph; 4-NP; 2,4-DNP; 2-NP; 2,4-DMP; 2,4-DCP; 2,4,6-TCP; PCP

a) Una vez estudiados los dos grupos de fenoles por separado se realiza una prueba con el cartucho de 0,2g de alúmina modificada y se prepara una solución con 2ug/mL de los 8 patrones objetos de estudio, obteniéndose como resultados en la adsorción los mostrados a continuación:

Tabla 25. Adsorción de los 8 patrones en el cartucho

Compuesto	masa inicial	masa final	%ads
Ph	2	1,51	24.5
4-NP	2	1,30	35.0
2,4-DNP	2	1,00	50.0
2-NP	2	1,23	38.5
2,4-DMP	2	1,28	36.0
DCP	2	0,86	57.0
TCP	2	0,64	68.0
PCP	2	0,00	100.0
TOTAL	16	7,82	51.1

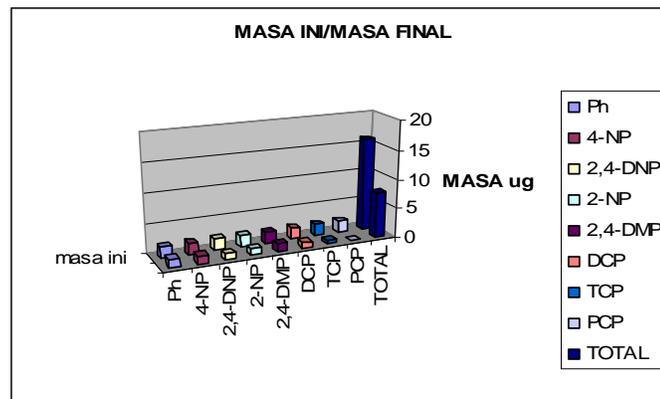


Gráfico 15. Comparación de la masa inicial de los patrones en solución vs la masa medida después del cartucho

Como se puede observar solo el PCP es adsorbido por completo en el cartucho, los otros compuestos que poseen una adsorción moderada son el TCP, DCP y 2,4 DNP con 68, 57 y 50% de adsorción respectivamente.

Los otros cuatro patrones son adsorbidos en porcentajes inferiores al 50% por lo que se estima que al aumentar la concentración de analitos disminuye el número de centros activos disponibles para la interacción del sólido y los fenoles y aumenta la competencia de los mismos.

El comportamiento de los compuestos no es lineal según aparecen en el cromatograma, ya que se aprecia que aunque el 2,4-DNP es el tercer compuesto en salir dicho análisis presenta una mayor adsorción en el cartucho que el 2-NP y el 2,4-DMP que son los analitos sucesivos en el cromatograma. Lo que hace inferir que la polaridad no es la única propiedad que influye en la interacción fenoles-alúmina modificada.

Una vez analizada la adsorción se procede a remover los fenoles del cartucho con volúmenes de 0,25 mL de metanol, se realizan 5 desorciones y cada una de las soluciones obtenidas es analizada por separado.

➤ Los resultados de los análisis de las desorciones son:

Tabla 26. Desorción de los 8 patrones con las diferentes desorciones del cartucho

Compuesto	masa recuperada en las desorciones				
	1º lav	2º lav	3º lav	4º lav	5º lav
Ph	0,48	0,20			
4-NP	0,41	0,31	0,08	0,03	0
2,4-DNP	0,90	0,28	0,00	0,00	0
2-NP	0,56	0,37	0,00	0,00	0
2,4-DMP	0,43	0,42	0,08	0,00	0
2,4-DCP	0,47	0,31	0,14	0,00	0
2,4,6-TCP	0,88	0,52	0,09	0,00	0
PCP	1,21	0,65	0,26	0,00	0
Total	5,34	3,06	0,65	0,03	0

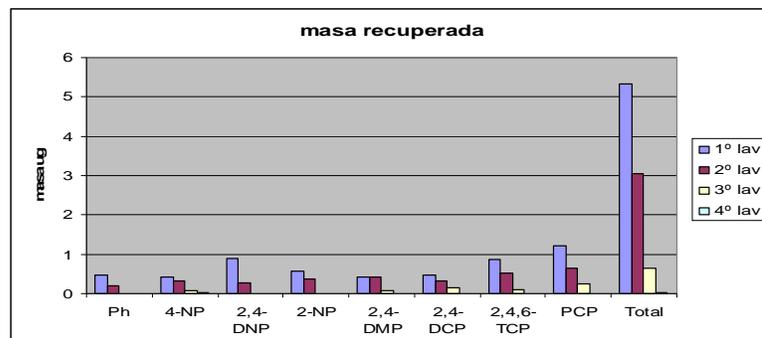


Gráfico 16. Masas recuperadas en los diferentes lavados y totales de masas recuperadas en cada lavado

La mayoría de los compuestos son recuperados con 3 lavados de 0,25mL de metanol solo el 4-NP fue detectado en el 4º lavado.

La comparación de la adsorción y la recuperación de los fenoles se muestra en la en la tabla 27

Tabla 27. Comparación de la adsorción y total recuperado en las desorciones

Compuesto	Adsorción	total rec
Ph	0,49	0,68
4-NP	0,70	0,83
2,4-DNP	1,00	1,18
2-NP	0,77	0,93
2,4DMP	0,72	0,92
DCP	1,14	1,38
TCP	1,36	1,49
PCP	2,00	2,12
total	8,18	9,53

La recuperación de los fenoles fue completa. La masa recuperada medida en el análisis arrojó como resultado la recuperación de toda la masa que fue adsorbida por el cartucho al pasar la solución acuosa que poseía los 8 patrones como se aprecia en la grafica que se muestra a continuación

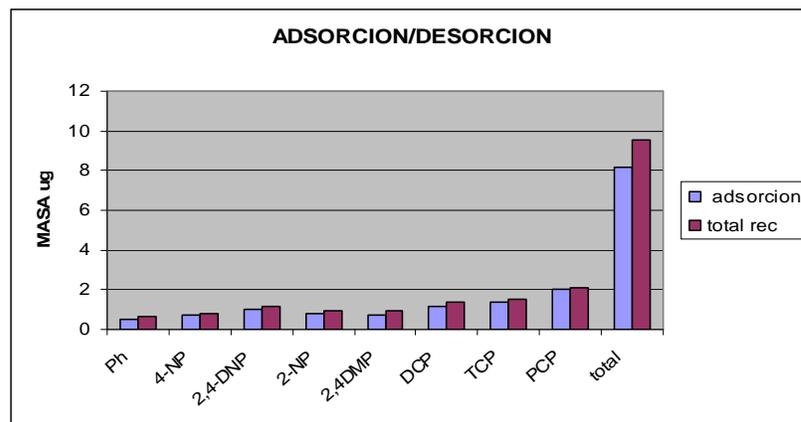


Gráfico 17. Comparación de la adsorción y el total recuperado de los patrones individuales y la suma de los mismos

b) Se realizó otra experiencia usando la solución con los 8 patrones de concentración 2ug/mL y se pasa por el cartucho con 0,4g de adsorbente, los resultados de esta experiencia son:

Tabla 28. Adsorción de los 8 patrones en el cartucho 0,4g de alúmina

Compuesto	Masa inicial	Masa final	%ads
Ph	2	1,11	44.5
4-NP	2	1,26	37.0
2,4-DNP	2	0,49	75.5
2-NP	2	0,29	85.5
2,4-DMP	2	0,00	100.0
DCP	2	0,00	100.0
TCP	2	0,00	100.0
PCP	2	0,00	100.0
TOTAL	16	3,15	80.3

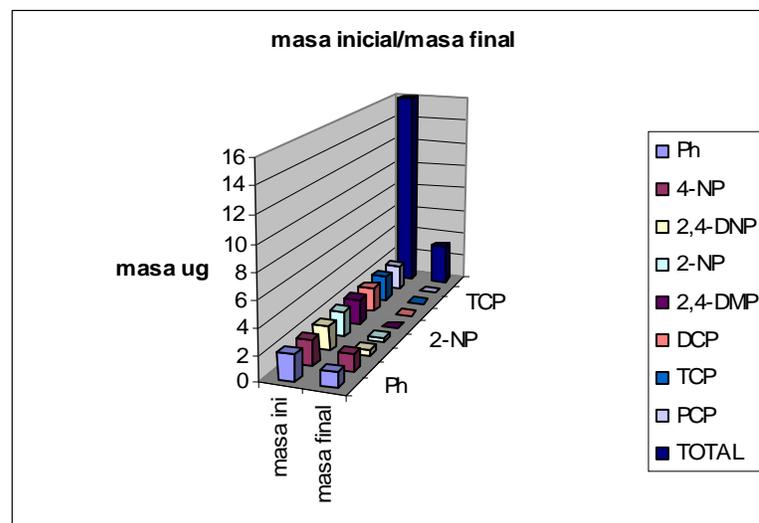


Grafico 18. Comparación de la masa inicial en solución y la masa final medida después del cartucho

Al aumentar la masa de sorbente al doble de la masa utilizada en el experimento anterior se observa como se obtiene la retención por completo de 4 de los patrones, solo dos patrones presentan adsorción menor al 50% lo que representa una mayor

eficiencia para la adsorción de contaminantes, comportamiento lógico ya que aumenta la capacidad de adsorción del cartucho a poseer mayor cantidad de sitios activos para la adsorción en la alúmina.

➤ La desorción se realizó mediante 5 lavados con 0,25 mL de metanol, los resultados son:

Tabla 29. Evaluación de la desorción con 5 lavados de 0,25 mL de metanol

Compuesto	masa recuperada en las desorciones				
	1° lav	2° lav	3° lav	4° lav	5° lav
Ph	0,53	0,31	0,13		
4-NP	0,46	0,24	0,13	0,05	0,01
2,4-DNP	0,81	0,23	0,00	0,00	0,00
2-NP	1,05	0,63	0,18	0,11	0,00
2,4-DMP	0,90	0,60	0,28	0,03	0,00
2,4-DCP	1,03	0,68	0,19	0,14	0,12
2,4,6-TCP	0,77	0,55	0,38	0,13	0,00
PCP	0,98	0,50	0,33	0,20	0,00
Total	6,53	3,74	1,62	0,66	0,13

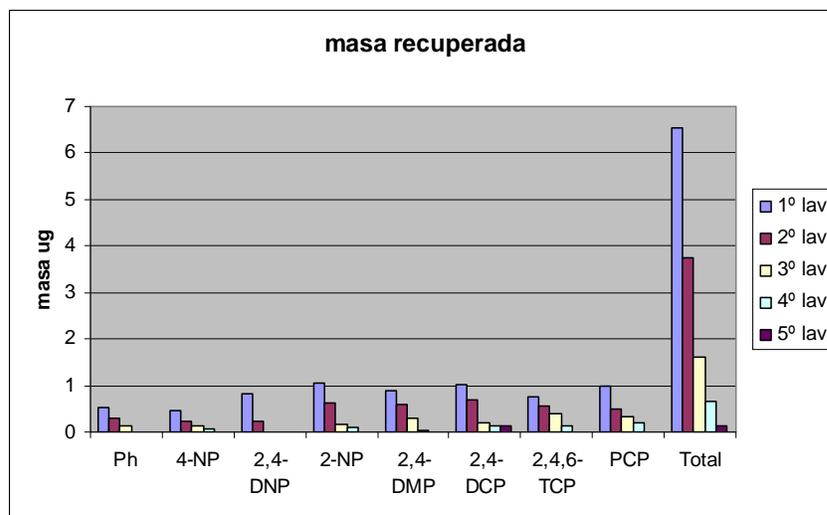


Gráfico 19. Desorción de los 8 patrones con 5 lavados de 0,25 mL de metanol

Al tener mayor cantidad de alúmina en el lecho del cartucho aumenta el volumen de solvente de lavado necesario para la remoción de los fenoles del cartucho. Los fenoles con mayor retención son recuperados en 5 lavados, aunque algunos son recuperados con 4 lavados y 2 compuestos se recuperan con 3 lavados o menos. Solo es 2,4-dinitrofenol es recuperado con 3 lavados.

- Comparando la adsorción y la desorción tenemos

Tabla 30. Comparación de la adsorción y la recuperación total

compuesto	adsorción	total rec
Ph	0,89	0,97
4-NP	0,74	0,89
2,4-DNP	1,51	1,04
2-NP	1,71	1,97
2,4DMP	2,00	1,81
DCP	2,00	2,16
TCP	2,00	1,82
PCP	2,00	2,01
total	12,85	12,67

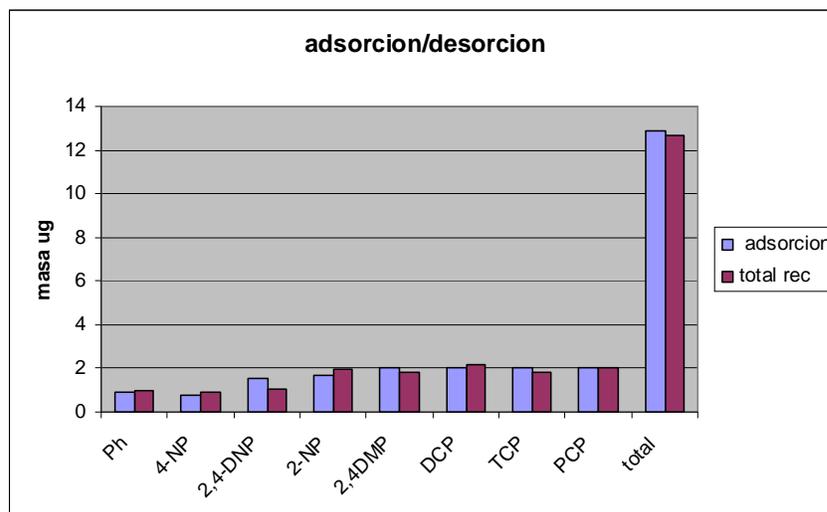


Grafico 20. Comparación de la adsorción y el total recuperado

A diferencia de la experiencia anterior no todos los analitos pueden ser recuperados en su totalidad con los lavados realizados, es decir, la masa recuperada medida de esos compuestos no corresponde al total de la masa adsorbida en el cartucho por lo que es necesario una mayor cantidad de solvente de lavado como se apreció en la presencia de analitos hasta en el último lavado realizado.

#### **5.3.2.8. Pruebas de preconcentración de fenoles**

a) Para la realización de estas pruebas se partió de soluciones de concentración  $5\mu\text{g/L}$  de pentaclorofenol y fenol que son los compuestos más y menos retenidos en el cartucho respectivamente. Utilizando la bomba peristáltica se pasan a través del cartucho 2 litros de esta solución acuosa.

Una vez finalizado el paso de solución por el cartucho, se han pasado a través de este  $10\mu\text{g}$  de los analitos, el cartucho se lava con 2 mL de metanol con la finalidad de obtener el analito en concentraciones que puedan ser determinadas con confiabilidad en el equipo de HPLC.

En experiencias repetidas para estos compuestos partiendo de esa solución de concentración inicial de  $5\mu\text{g/L}$  no se pudo realizar la determinación de los analitos una vez se extraían del cartucho ya que las áreas que generaban ambos compuestos se encontraban por debajo de los valores de la curva de calibración realizada en estos experimentos, que fue hecha entre  $0,1\text{ mg/L}$  hasta  $1\text{ mg/L}$ .

Estos valores de recuperación se encuentran por debajo de lo esperado según las experiencias de adsorción realizadas durante el trabajo de investigación.

b) Utilizando los resultados de la experiencia anterior, se utiliza una nueva solución de ambos patrones, esta vez de  $50\mu\text{g/L}$  y se pasan con la bomba peristáltica 200 mL de

esta solución y los analitos desorbidos con 2 mL de metanol. Esta experiencia se realiza probando diferentes flujos generados por la bomba peristáltica y de esta manera evaluar la influencia del flujo de solución contaminada en la adsorción del cartucho. Para cada flujo se realiza por triplicado la adsorción-desorción.

Obteniéndose como resultados los mostrados a continuación:

➤ Para el fenol:

Tabla 31. Evaluación de la velocidad de adsorción y la masa de fenol recuperada

flujo	masa rec
17	0,562
17	0,513
14	0,543
14	0,467
11	0,566
11	0,477
8	0,519
8	0,460
5	0,460
5	0,418
promedio	0,50
SD	0.05
%prom rec	4.98%

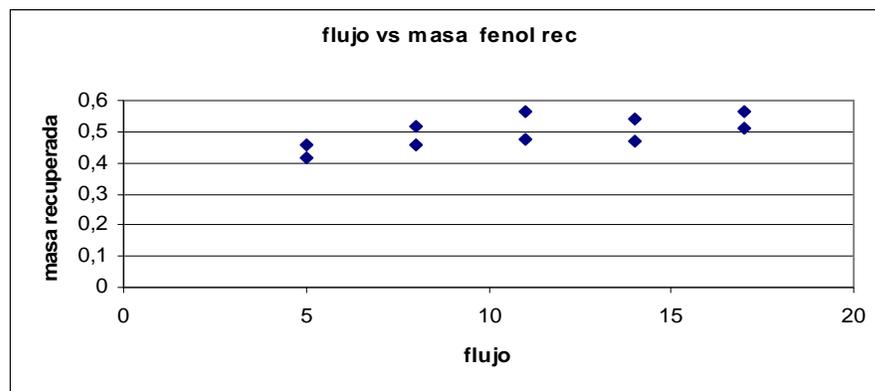


Gráfico 21. Flujo de solución en el cartucho vs. Masa de fenol recuperada con los lavados

➤ Para el Pentaclorofenol

Tabla 32. Evaluación de la velocidad de adsorción y la masa de pentaclorofenol recuperada

flujo	masa rec
5	1,323
5	0,764
8	0,864
8	1,163
11	1,343
11	0,824
14	1,502
14	1,313
17	1,123
17	1,323
promedio	1,2
SD	0.3
%prom rec	11,50%

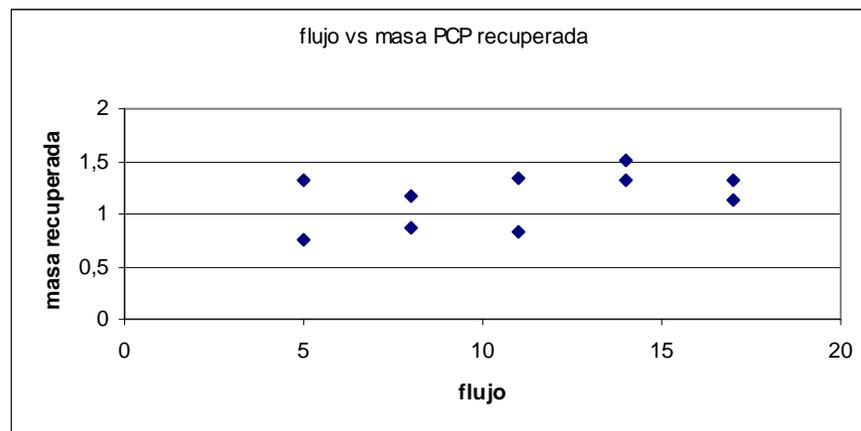


Gráfico 22. Flujo de solución en el cartucho vs masa de PCP recuperada

Con estos resultados se hace inviable una preconcentración de los fenoles con la alúmina modificada ya que los porcentajes de recuperación de los analitos en este experimento son muy bajos y se comprueban los resultados de la experiencia anterior

en la cual los analitos no podían ser determinados ya que los valores de las áreas en el cromatograma son inferiores a los patrones de la curva de calibración.

Los valores de recuperación son estimados de la cantidad de analito que debió ser retenido en el cartucho y de la medida de los valores de analito recuperado una vez lavado el cartucho. En ambas experiencias se pasaron por el cartucho 10µg de los analitos y era de esperarse según las pruebas preliminares de adsorción y desorción una recuperación muy superior a la obtenida en las pruebas finales.

Una de las causas que puede explicar que los resultados no concuerden es la diferencia entre los métodos utilizados para la adsorción de los contaminantes en la alúmina ya que durante las pruebas preliminares todas las soluciones son pasadas por el cartucho utilizando jeringas y haciendo presión positiva con los émbolos de las mismas para hacer circular las soluciones a través del cartucho. En cambio con las pruebas de preconcentración las soluciones fueron pasadas por el cartucho utilizando una bomba peristáltica. Por lo que se podría pensar en un estudio a profundidad de las condiciones y rango del flujo de solución contaminada con la finalidad de obtener preconcentraciones que concuerden con las pruebas preliminares de adsorción en los cartuchos

## 6. CONCLUSIONES

- Las condiciones optimizadas permiten separar y determinar por HPLC los 11 fenoles señalados por la EPA como contaminantes de remoción prioritaria de los efluentes acuáticos.
- Los límites de detección de la técnica permiten utilizar la HPLC como método de control ambiental para líquidos que vayan a ser descargados en forma directa o indirecta a ríos, estuarios, lagos y embalses.
- Adicionalmente se ensayó un método de SPE para preconcentrar los fenoles con un sólido desarrollado dentro de la Universidad Central de Venezuela con la finalidad de disminuir los límites de detección y utilizar la técnica para el control de fenoles en aguas de consumo humano.
- Aunque las propiedades de adsorción y desorción de la alúmina son adecuadas para realizar la preconcentración de debe continuar el estudio del sólido con la finalidad de realizar el proceso en forma continua.
- El método propuesto permite analizar el 4-NP; 2,4-DNP; 2,4-DMP y 2-M-4,6-DNP. Compuestos que no pueden ser determinados en la norma COVENIN.
- En las pruebas preliminares de adsorción se observaron recuperaciones cercanas al 100% cuando se usaron pequeños volúmenes; al utilizar volúmenes y concentraciones reales los resultados disminuyen drásticamente por lo tanto es necesario un estudio con mayor profundidad para optimizar el procedimiento.

## 7. RECOMENDACIONES

- Optimizar las condiciones de adsorción y desorción para realizar la preconcentración en el sólido adsorbente para llevar a cabo el método en forma continua

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Liu, X., Ji, Y., Zhang, Y., Zhang, H. y Liu, M. (2007). Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for determination of phenols in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1165. pp. 10-17. disponible en internet: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
2. Recuperado de [www.textoscientificos.com/quimica/aromaticos/uso-industrial-4](http://www.textoscientificos.com/quimica/aromaticos/uso-industrial-4). Ultima visita 13-10-07
3. Peñalver, A., Pucurull, E., Borrull, F., Marce, R.M. (2002) Solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*. Vol. 593. pp. 79-87 disponible en internet: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
4. República de Venezuela. Gaceta Oficial N° 5.021 Extraordinario. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos, Caracas 18 de diciembre 1995. Año CXXIII, Mes III
5. Fajardo, C., Frank, A., Urbina, S., Marianis, J. (2007) Preparación de alúminas modificadas orgánicamente para la remoción de contaminantes en aguas. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela
6. Zambrano, C., (1993) Estudio de la oxidación de fenoles mediante ozono generado plasmas de alto voltaje. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela
7. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Recuperado de: [www.mtas.es](http://www.mtas.es)
8. Skoog, D., Holler, F., Nieman, T. (2003). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid. España. Quinta Edición, Cap 28, pp 786 -722
9. Lanças, F. M., (2004) *Extração em Fase Sólida*. San Carlos, Brasil. Primera Edición, Cap. I, pp. 7-16.
10. Gonzalez-Toledo, E., Prat, M., Alpendurada, M. Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water.

Journal of Chromatography A. Vol. 923. pp. 45-52 disponible en internet:  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

11. Olaechea, M. (2005) Uso de la Microextracción en Fase Sólida (SPME) para el análisis de clorofenoles por le técnica de Cromatografía Líquida. Trabajo Espacial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela

12.Asok, A., Anjali, P. (2005) Removal of phenol from aquatic environment by SDS-modified alumina: Batch and fixed bed studies. Elsevier India pp. 168-172

13.Norma Venezolana COVENIN 2917 - 92, Aguas Naturales, Industriales y Residuales, Determinación de Fenol

## **9. ANEXOS**

### Formula para el cálculo del error típico de la regresión

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

Donde los valores  $\hat{y}_i$  representan los valores sobre la recta de regresión calculados sobre los valores independientes de x, es decir los valores ajustados de y

### Desviación estándar de la pendiente

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

### Límite de Detección (LOD)

$$y_B + 3s_B$$

Donde  $y_b$  es la concentración de analito capaz de dar una señal igual a la señal del blanco y  $s_b$  es la desviación estándar del blanco

### Límite de Determinación (LQD)

$$y_B + 10s_B$$

Para los cálculos de los límites de detección y los límites de cuantificación se utilizaron los valores del punto de corte como una estimación de  $y_b$  y  $s_{y/x}$  como una

estimación de  $s_b$  según el método para la determinación de ambas figuras de mérito planteado en el Miller & Miller

**Adsorción de Ph; 2,4-DCP; 2,4,6-TCP; PCP de la solución de partida de 2 ppm por los diferentes cartuchos**

	cartucho 5	cartucho 6	cartucho 7	cartucho 8	cartucho 9		
Compuesto	masa ads	promedio	SD				
Ph	0,52	0,56	0,70	0,74	0,64	0,63	0,09
DCP	1,76	1,73	2,00	2,00	2,00	1,9	0,1
TCP	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00
PCP	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00
TOTAL	6,28	6,29	6,70	6,74	6,64	6,5	0,2

**Adsorción de Ph; 2,4-DCP; 2,4,6-TCP; PCP de la solución de partida de 2pp por los diferentes cartuchos**

	cartucho 5	cartucho 6	cartucho 7	cartucho 8	cartucho 9		
Compuesto	masa ads	promedio	SD				
Ph	0,92	1,20	1,08	1,44	1,96	1,3	0,4
DCP	2,77	3,58	3,61	4,00	4,00	3,6	0,5
TCP	2,61	3,56	4,00	4,00	4,00	3,6	0,6
PCP	3,32	4,00	4,00	4,00	4,00	3,9	0,3
TOTAL	9,62	12,34	12,69	13,44	13,96	12	2

**Reproducibilidad de la adsorción en el cartucho de 0,2g de adsorbente**

Compuesto	masa ads 1	masa ads 2	masa ads 3	promedio	SD
Ph	0,50	0,86	0,49	0,6	0,2
DCP	1,96	2,00	2,00	1,99	0,02
TCP	2,00	2,00	2,00	2,00	0
PCP	2,00	2,00	2,00	2,00	0
Total	6,46	6,86	6,49	6,6	0,2

**Estudio de la reproducibilidad de la desorción con 2 volúmenes de 0,25mL de metanol**

Compuesto	masa recuperada en los lavados						prom 1º lav	SD	prom 2º lav	SD
	1º lav 1	2º lav 1	1 lav 2	2º lav 2	1º lav 3	2º lav 3				
Ph	0,60	0,00	0,62	0,00	0,53	0,00	0,58	0,05	0	0
DCP	1,34	0,23	1,43	0,15	1,18	0,20	1,3	0,1	0,19	0,1
TCP	1,50	0,12	1,56	0,15	1,23	0,20	1,4	0,2	0,16	0,04
PCP	0,87	0,32	0,95	0,33	1,04	0,27	0,95	0,09	0,31	0,09
Total	4,32	0,68	4,55	0,62	3,97	0,67	4,3	0,3	0,7	0,2