



UMSNH
UMSNH



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE COMPUESTOS TRICLORADOS DEL FENOL A PARTIR DE LA CLORACIÓN DEL 3-CLOROFENOL.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

VICTOR MANUEL CARMONA REYES

ASESOR INTERNO: M.C. ANA MARÍA NÚÑEZ GAYTÁN.

ASESOR EXTERNO: DRA. MA. GUADALUPE GARNICA ROMO.

MORELIA MICHOACÁN

JUNIO DEL 2010

ÍNDICE:

Índice de Tablas y Cromatogramas:	iii
1 CAPITULO	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 OBJETIVO(S)	4
1.4 HIPÓTESIS	4
2 CAPITULO MARCO TEÓRICO	5
2.1 PROCESO DE CLORACIÓN	5
2.2 TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DEL FENOL A CAUSA DE LA CLORACIÓN	9
2.2.1 Consideraciones sobre los subproductos de la desinfección	10
2.2.2 Trihalometanos	10
2.2.3 Formación de Trihalometanos	10
2.2.4 Clorofenoles	11
2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS FENOLES Y CLOROFENOLES	12
2.3.1 Reactividad y estabilidad	13
2.3.2 Procedencia de los clorofenoles	14
2.4 ASPECTOS AMBIENTALES DE LOS CLOROFENOLES	14
2.5 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LOS TRICLOROFENOLES	17
2.6 APLICACIONES DE LOS TRICLOROFENOLES UTILIZADOS	18
2.7 CROMATOGRAFÍA	19
2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS MÁS RELEVANTES PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES	20
2.8.1 Métodos espectrofotométricos en ultravioleta-visible (uv-vis)	20
2.8.2 Métodos cromatográficos	21
2.9 DIFERENTES MÉTODOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	25
2.10 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA	26
2.10.1 Características de los disolventes de mayor empleo en cromatografía de líquidos de fase reversa	30

2.11	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE FENOLES.....	30
2.11.1	Método de extracción en fase sólida.....	31
3	CAPITULO DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
3.1	METODOLOGÍA	34
3.1.1	EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS FENOLES	34
3.1.2	Elución y análisis.....	35
3.2	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	35
3.3	REACCIÓN DE CLORACIÓN DEL 3-CLOROFENOL	35
3.4	EQUIPO Y ACCESORIOS UTILIZADOS	36
3.4.1	Otros equipos.....	36
3.4.2	Otros materiales.....	37
3.5	ESTÁNDARES	38
3.6	REACTIVOS	38
3.7	DISOLVENTES	38
3.8	DISOLUCIONES ESTÁNDAR	39
3.9	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	39
4	CAPITULO ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
4.1	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	41
4.2	RESULTADOS OBTENIDOS DE LA REACCIÓN DE CLORACIÓN DEL 3-CLOROFENOL EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ESTUDIADAS.	49
4.2.1	Ensayos de estudio de la reacción aforado con el buffer de fosfatos de ph=7	49
4.2.2	Ensayos de estudio de la reacción aforado con agua nanopura (agua desionizada).....	55
5	CAPITULO CONCLUSIONES.....	61
6	CAPITULO BIBLIOGRAFÍA.....	62
7	APENDICE A	64

Índice de Tablas y Cromatogramas:

	Pag.
<i>Tabla 1. Características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable.-----</i>	6
<i>Tabla 2. Parámetros guía de la OMS para la calidad del agua potable; subproductos de la desinfección.-----</i>	11
<i>Tabla 3. Las concentraciones máximas permisibles en partes por billón (ppb) de clorofenoles en agua para protección de la salud humana establecidas por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA).-----</i>	11
<i>Tabla 4. Producción a nivel mundial de clorofenoles.-----</i>	14
<i>Tabla 5. Clasificación de la EPA de los compuestos fenólicos por su toxicidad.-----</i>	16
<i>Tabla 6. Valor máximo aceptable para la calidad del agua potable (OPS/OMS).-----</i>	16
<i>Tabla 7. Niveles guía de calidad de agua por la OMS para protección de vida acuática (Agua dulce).----</i>	16
<i>Tabla 8. Longitudes de onda mínima de trabajo en la zona de UV para disolventes frecuentes en CLAR.-----</i>	23
<i>Tabla 9. Aplicaciones de la cromatografía líquida en fase reversa.-----</i>	29
<i>Tabla 10. Características de la cromatografía en fase reversa.-----</i>	29
<i>CROMATOGRAMA 1-----</i>	42
<i>CROMATOGRAMA 2-----</i>	43
<i>CROMATOGRAMA 3-----</i>	43
<i>CROMATOGRAMA 4-----</i>	44
<i>CROMATOGRAMA 5-----</i>	45
<i>CROMATOGRAMA 6-----</i>	46
<i>CROMATOGRAMA 7-----</i>	49
<i>CROMATOGRAMA 8-----</i>	50
<i>CROMATOGRAMA 9-----</i>	51
<i>CROMATOGRAMA 10-----</i>	52
<i>CROMATOGRAMA 11-----</i>	52
<i>CROMATOGRAMA 12-----</i>	53
<i>CROMATOGRAMA 13-----</i>	54
<i>CROMATOGRAMA 14-----</i>	54
<i>CROMATOGRAMA 15-----</i>	55
<i>CROMATOGRAMA 16-----</i>	56
<i>CROMATOGRAMA 17-----</i>	57
<i>CROMATOGRAMA 18-----</i>	58

1 CAPITULO

1.1 INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural indispensable para la vida. Sin embargo, el progreso y los avances logrados por el hombre han llevado a producir miles de productos químicos con diferentes finalidades que han contribuido a mejorar la calidad de vida pero que, por otro lado, son introducidos directa o indirectamente en el agua causando serios problemas de contaminación [1]. Por lo cual su análisis es muy importante para asegurar y mantener la calidad necesaria para que su utilización no tenga ningún peligro para la salud de los seres vivos.

El cloro se usa en el tratamiento de aguas como agente oxidante y como desinfectante. Su acción desinfectante destruye los organismos patógenos presentes en el agua. Como oxidante, se emplea en el control de sabor, olor y para la eliminación de color debida a la presencia de materia orgánica [2]. En muchos países actualmente se utiliza la cloración para la purificación de aguas potables y residuales. El uso excesivo o inadecuado del cloro puede dar como resultado la formación de compuestos policlorados derivados del fenol, que son potencialmente tóxicos alterando la calidad del agua y por lo tanto constituyen un serio problema ambiental [3-4].

El fenol puede entrar en el medio acuático a través de la descarga accidental o intencional en las aguas residuales, industriales, agrícolas y domésticas. Entre las fuentes más importantes de contaminación por fenoles se pueden mencionar las siguientes: hornos de coque, procesos de conversión de carbón, refinerías de petróleo, petroquímica, fábricas de resinas y otras industrias.

Dado que en nuestro país la cloración del agua es el método más comúnmente utilizado para su purificación, es indispensable realizar estudios más profundos para conocer las transformaciones que puede sufrir el fenol durante el proceso de cloración. La clorooxidación de los fenoles conlleva a la transformación progresiva de los mismos en una primera etapa hacia compuestos policlorados más tóxicos y

posteriormente, dependiendo de las condiciones en que el proceso de cloración se lleve a cabo dan lugar a la formación de compuestos alifáticos clorados de cadena corta [5].

La mayoría de los compuestos orgánicos contaminantes han sido determinados tanto en aguas superficiales como en subterráneas [6,7] lo que ha incrementado la preocupación existente sobre el posible impacto de estos compuestos en el medio ambiente así como en la salud de las personas y animales. En consecuencia, diferentes planteles como la Unión Europea (UE), la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA). Han introducido una serie de regulaciones y normas en las que se indican las concentraciones máximas a las que se pueden encontrar algunos de estos compuestos en aguas de diferente procedencia [8,9].

Este problema de contaminación que afecta a nuestro medio ambiente, ha derivado en el interés que tienen diversos planteles de investigación para desarrollar técnicas analíticas sensibles y eficientes que permitan determinar microcontaminantes orgánicos en matrices ambientales. Uno de los métodos de separación y caracterización [10,11] más preciso y sensible que se aplica para la determinación de compuestos orgánicos es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Existe una preocupación ambiental y de salud por los problemas que originan los residuos industriales, principalmente los denominados peligrosos. Esta preocupación surgió, por como se tienen que afrontar problemas de contaminación del medio ambiente y de sus efectos nocivos en la salud pública, por la inadecuada utilización de los residuos industriales.

Los efluentes generados por las industrias suelen contener compuestos orgánicos perjudiciales para el medio ambiente especialmente para los suelos, las fuentes naturales de agua y los organismos que habitan en dichos medios. En muchos casos, los compuestos se presentan con una concentración tan baja que no es económicamente posible su recuperación, pero lo suficientemente alta como para contaminar si se desechan sin tratamiento.

Por lo mencionado anteriormente este proyecto de tesis es muy importante en el área ambiental, debido a la gran aplicación de los clorofenoles en diferentes áreas de la industria química, los cuales han desarrollado gran contaminación de aguas y suelos. Por ello, es necesario desarrollar métodos analíticos en el empleo de técnicas analíticas precisas y exactas para poder determinar estos contaminantes a nivel de trazas en aguas.

1.3 OBJETIVO(S)

OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la reacción de cloración del 3-clorofenol y determinar que compuestos triclorados se forman y a que concentraciones.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Implementar una metodología analítica de extracción en fase sólida en línea con la cromatografía de líquidos de alta resolución que permita extraer, preconcentrar, recuperar, separar y caracterizar los triclorofenoles formados durante la cloración del 3-clorofenol a diferentes condiciones experimentales.

1.4 HIPÓTESIS

La implementación de la metodología analítica de extracción en fase sólida en línea con la cromatografía de líquidos de alta resolución (EFS-CLAR) permitirá caracterizar los triclorofenoles formados durante la cloración del 3-clorofenol en función de las condiciones experimentales utilizadas y mediante un detector UV.

2 CAPITULO MARCO TEÓRICO

2.1 PROCESO DE CLORACIÓN

En la actualidad, el sistema de desinfección más utilizado a nivel mundial, tanto en agua potable como en aguas residuales tratadas, es el cloro [12]. Ya sea que el cloro se agregue por vía de cloración (cloro gas) ó hipocloraciFón (hipoclorito de sodio ó de calcio), la reacción química por la que se obtiene la purificación y saneamiento del agua es la misma.

Cuando se agrega cloro al agua la acción desinfectante y sanitaria que resulta es efectuada mediante un agente químico intermedio, el "Ácido Hipocloroso". El cloro y el agua reaccionan para formar el ácido hipocloroso de acuerdo con la ecuación de equilibrio: $\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$

El ácido hipocloroso, es un agente oxidante; el Cl tiene estado de oxidación +1 y se reduce fácilmente a Cl^- . El ácido hipocloroso es un componente activo de la mayoría de los detergentes y agentes blanqueadores.

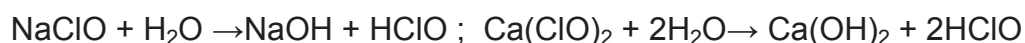
El cloro es un desinfectante barato, muy eficaz, fácil de aplicar y fácil de dosificar. Sin embargo, su uso ha generado cierta polémica, debido a que puede introducir compuestos organoclorados en el agua de consumo humano. Los fenoles son compuestos que reaccionan fácilmente con el ácido hipocloroso, originando una gran variedad de compuestos organoclorados. Los fenoles no se encuentran solamente en aguas residuales industriales, sino que se existen, de forma natural, en las aguas superficiales como constituyentes de los ácidos húmicos.

Los ácidos húmicos son moléculas complejas que contienen anillos bencénicos con una gran variedad de sustituyentes, incluyendo el grupo OH.

Aunque tienen una naturaleza polimérica, algunos ácidos húmicos son solubles en aguas superficiales y subterráneas, penetrando en el suministro de agua. El producto más abundante de la reacción entre el ácido hipocloroso y los ácidos húmicos es el

cloroformo (CHCl_3). Por tanto, el cloroformo se encuentra a nivel de trazas en la mayoría de las aguas cloradas.

En el caso de los hipocloritos, se produce la disociación de ambas sales de acuerdo a las ecuaciones:



El objetivo principal del uso del cloro en el tratamiento de agua es el de desinfectarla, para así asegurar su potabilización. Las cantidades de cloro libre residual recomendadas por los planteles competentes para aguas potables oscilan entre 0.5 y 1.0 ppm y entre 1.5 y 3.0 ppm para piscinas.

En los casos de aguas cuya calidad se ha comprobado y se consideran aptas para ser susceptibles de consumo humano, como pueden ser muchas aguas subterráneas y aquéllas superficiales que cumplan las características incluidas, sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable para ser clasificadas como Tipo A1, su tratamiento previo al consumo humano consiste en un tratamiento físico simple (como podría ser la filtración) seguido de un proceso de desinfección. En el caso de Tipo A2, es necesario un tratamiento físico normal, tratamiento químico y desinfección. Para el Tipo A3 se requiere tratamientos físico y químico intensivos, afino y desinfección.

Tabla 1. Características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable.

Parámetro	Unidad	Tipo A1	Tipo A2	Tipo A3
Ph	-	(6.5-8.5)	(5.5-9.0)	(5.5-9.0)
Sólidos en suspensión	mg/l	(25)	-	200
Fluoruros	mg/l F	1.5	(1.7)	(50)
Fenoles	mg/l Fenol	0.001	0.005	(0.7)
Coliformestotales(37°C)	µm/100ml	(50)	(5000)	(50000)
Coliformes fecales	µm/100ml	(20)	(2000)	(20000)

Las cifras entre paréntesis se tomarán como valores indicativos deseables con carácter Provisional.

Los compuestos fenólicos que incluyen al fenol y compuestos orgánicos con uno o más grupos OH y otros sustituyentes como los clorofenoles, poseen efectos altamente adversos aún en proporciones pequeñas: 0.005 mg/L de fenol en agua provocan cambios en el gusto y olor al combinarse con cloro para dar clorofenoles.

Los fenoles son tóxicos para los peces cuando se superan los 2 mg/L y pueden impartir aroma y sabor característicos en el pescado en concentraciones más pequeñas aún. Poseen una alta demanda de oxígeno (2.4 mg O₂/ mg fenol) pudiendo agotar la presencia de oxígeno en agua si la concentración de fenol es elevada. La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) recomienda niveles de fenoles inferiores a 0.1 mg/L en las descargas.

Existen varios métodos para tratar residuos fenólicos tales como recuperación, incineración, adsorción, tratamientos biológicos y oxidación (con ozono, aire húmedo y catalítica). La recuperación, por medio de extracción líquido - líquido se recomienda para flujos de 200 litros por minuto (Lpm) ó mayores y concentraciones superiores a 2000 mg/L. La eficiencia de este proceso es del 99.7%, por lo que de todos modos se requiere un tratamiento adicional para acondicionar la descarga. La incineración se recomienda para tratar efluentes altamente concentrados. El fenol se convierte en dióxido de carbono y agua en cámaras de combustión especiales con gran consumo de energía, lo que disminuye su atractivo económico. La adsorción con carbón activado se recomienda para el tratamiento de soluciones con baja concentración. La carga puede reducirse a 1 mg/L de fenol.

Los procesos químicos de oxidación tales como cloración, ozonización, oxidación con permanganato de potasio o peróxido de hidrógeno, oxidación con aire húmedo y oxidación catalítica son algunas de las posibilidades viables para la purificación de aguas residuales. La oxidación química puede aplicarse para a) tratar efluentes concentrados, siendo más económica que los procesos de incineración y tratamiento

biológico; b) como pretratamiento para unificar y acondicionar la alimentación antes de utilizar un tratamiento biológico; c) como etapa final para lograr niveles de contaminante adecuados (inferiores a 1mg/ L).

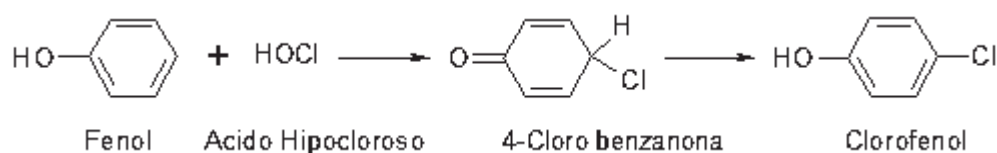
Por medio de la oxidación química con peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio ó ClO_2 los fenoles se convierten en compuestos orgánicos intermedios, pero la demanda química de oxígeno (DQO) puede ser elevada aún, en cuyo caso será necesario realizar más tratamientos. La oxidación química puede ser extremadamente costosa si se desea la oxidación completa de todos los compuestos orgánicos presentes. Una alternativa menos costosa es oxidar parcialmente los compuestos orgánicos y luego someterlos a tratamiento biológico. El proceso denominado “oxidación con aire húmedo” requiere condiciones extremas de operación (200-300°C y 70-130 bar), es eficiente para el tratamiento de soluciones diluídas, pero es muy costoso.

Las concentraciones de fenol en los efluentes residuales de las industrias químicas pueden variar de unos pocos ppm a concentraciones del orden de 1-10 g/L en las unidades de licuefacción de carbón, 0.6-2 g/L en las plantas de resinas fenólicas, fabricas de fertilizantes, explosivos y herbicidas o incluso en las refinerías 40 g/L.

En general, la estructura fenólica y los compuestos alifáticos no saturados son bastante comunes. Por ejemplo, los derivados de la lignina, los ácidos húmicos y fúlvicos, los ácidos grasos no saturados, etc.

En el caso de compuestos orgánicos, los electrones más reactivos y por lo tanto los compuestos más fáciles de combinar serán aquellos que en su estructura tengan doble enlace. En la cloración de compuestos orgánicos se reconocen ciertos mecanismos típicos. Por ejemplo:

Reacción con el anillo aromático, especialmente el fenólico.



2.2 TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DEL FENOL A CAUSA DE LA CLORACIÓN.

La cloración puede ser extensiva, es decir, puede encontrarse la serie de fenoles clorados hasta pentaclorofenol [13]. La actividad de cada anillo depende del tipo de compuesto de origen. Es posible que con una cloración intensiva y a concentraciones más elevadas se produzcan compuestos orgánicos clorados de menor peso molecular como los trihalometanos.

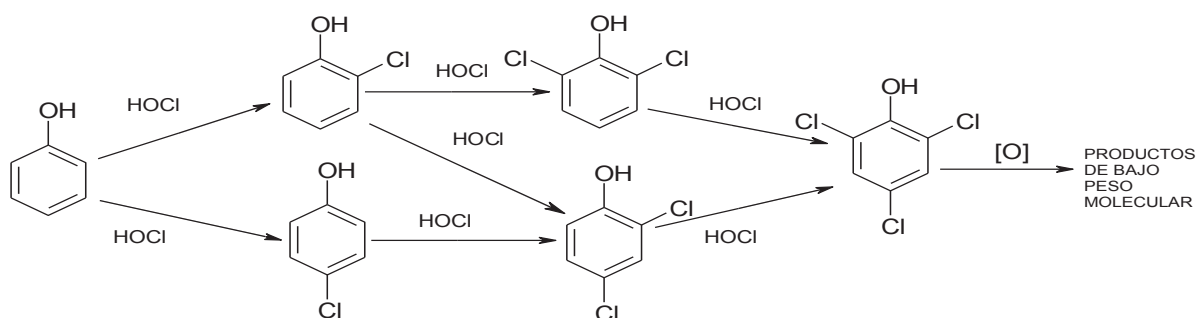
Los compuestos fenólicos en aguas cloradas se ha observado la transformación de estos en productos que probablemente pudieran ser compuestos policlorados mucho más tóxicos que los compuestos iniciales.

El cloro reacciona con compuestos orgánicos traza presentes en cuerpos de agua, los productos formados pueden tener sabor u olor desagradables.

La cloración del fenol se lleva a cabo por la sustitución en pasos de las posiciones 2, 4 y 6 del anillo aromático en dirección a la formación de los productos de oxidación no fenólicos. Se producen 8 reacciones interdependientes que ocurren simultáneamente.

Inicialmente el fenol es clorado y forma 2 y 4-clorofenol. El 2-Clorofenol es clorado para formar el 2,4-diclorofenol y 2,6-diclorofenol, mientras que el 4-Clorofenol forma el 2,4-diclorofenol. Ambos compuestos diclorados son clorados para formar el 2,4,6-Triclorofenol. Este compuesto reacciona con cloro acuoso para originar una mezcla de productos de oxidación no fenólicos [14].

Esquema de la reacción de cloración del fenol.



2.2.1 Consideraciones sobre los subproductos de la desinfección

Además de proveer protección contra los patógenos virales y bacterianos, los desinfectantes con base de cloro también mejoran la calidad del agua, que puede ser deteriorada por las algas y la vegetación podrida (color, sabor y olor). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado que el sabor promedio y la concentración de umbrales de olor del cloro residual aumenta de 0.075 ppm a 0.450 ppm cuando el pH aumenta de 5-9. A pH 7.0 el umbral promedio fue de 0.156 ppm con un intervalo de variación de 0.02-0.29 ppm; sin embargo, cuando el cloro se combina con sustancias fenólicas y con otros compuestos orgánicos, el sabor desagradable y los olores puede aumentar. El cloro ayuda a controlar que la bacteria vuelva a crecer, proporcionando un nivel residual de desinfectante en el sistema de distribución.

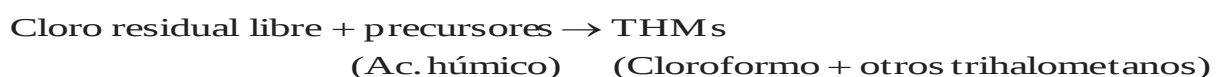
2.2.2 Trihalometanos

Los trihalometanos (THMs) constituyen un grupo de compuestos orgánicos, que como su nombre lo indica, se consideran por su nomenclatura como derivados del metano (CH_4), en cuya molécula, tres átomos de hidrógeno han sido sustituidos por igual número de halógenos (cloro, flúor, bromo o yodo).

En relación con la contaminación del agua potable, el problema hasta el momento se ha limitado con respecto a cuatro miembros del grupo que son: Cloroformo (CHCl_3), bromodiclorometano (CHBrCl_2), dibromoclorometano (CHBr_2Cl) y bromoformo (CHBr_3) el cual se asocia estrechamente con la ozonación. En vista que los cuatro compuestos anotados anteriormente se producen conjuntamente, con frecuencia se consideran como un grupo, denominado trihalometanos totales (THMsT).

2.2.3 Formación de Trihalometanos

La formación de los trihalometanos, durante la desinfección del agua con el cloro libre, obedece a un complicado mecanismo, por el cual las especies químicas que el halógeno forma con el agua, reaccionan con los derivados del humus que ese medio habitualmente contiene.



2.2.4 Clorofenoles

Los clorofenoles están presentes en el agua como subproductos de la reacción del cloro con compuestos fenólicos, tales como los biocidas, o como productos de la degradación de herbicidas del grupo fenoxi.

Los tres clorofenoles más probables que pueden resultar de la cloración son 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol. Los umbrales gustativos son respectivamente 0.3 y 2 µg/L. Las concentraciones de los clorofenoles en el agua potable son generalmente menos de 1 µg/L.

Tabla 2. Parámetros guía de la OMS para la calidad del agua potable; subproductos de la desinfección.

Parámetros	Valor máximo permisible (µg/L)
Desinfectante (monocloramina)	4000
Subproductos de la desinfección	
Bromato	25
Clorito	200
Clorofenoles	
2,4,6-TCF	200
Formaldehido	900
Trihalometanos	
Bromoformo	100
Dibromoclorometano	100
Bromodiclorometano	60
Cloroformo	200

Tabla 3. Las concentraciones máximas permisibles en partes por billón (ppb) de clorofenoles en agua para protección de la salud humana establecidas por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) [15] son:

Compuesto	Concentración Máxima (ppb)
3-CLOROFENOL	50
4-CLOROFENOL	30
2,5-DICLOROFENOL	3
2,6-DICLOROFENOL	3
2,4,5-TRICLOROFENOL	10
2,4,6-TRICLOROFENOL	100
2,3,4,6-TETRACLOROFENOL	253

2.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS FENOLES Y CLOROFENOLES

Los fenoles son compuestos en los cuales los átomos de hidrógeno de sistemas aromáticos han sido reemplazados por hidróxilos. Según el número de hidróxilos unidos directamente al núcleo aromático, los fenoles se llaman monofenoles, difenoles, trifenoles, etc [16].

Los fenoles son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrófila, porque los electrones no enlazantes del grupo hidroxilo estabilizan al complejo sigma que se forma por ataque en la posición orto-para. Los fenoles son sustratos excelentes para halogenación, nitración, sulfonación y algunas reacciones de Friedel-Crafts. Como son muy reactivos, generalmente los fenoles se alquilan o se acilan con catalizadores de Friedel-Crafts, relativamente débiles (como el HF) para evitar sobrealquilación o sobre acilación. Generalmente los fenoles se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, que es el fenol. Algunas veces, los fenoles se denominan hidroxicompuestos y los metilfenoles reciben el nombre especial de cresoles. Los fenoles abundan en la naturaleza y sirven como intermediarios en la síntesis industrial de productos tan diversos como adhesivos y antisépticos. El fenol es un compuesto aromático derivado del benceno.

Los fenoles son mucho más ácidos que los alcoholes y la consecuencia práctica de esta acidez es que los fenoles son solubles en hidróxido de sodio acuoso diluido. De este modo, con frecuencia es posible separar un componente fenólico de una mezcla de compuestos por medio de una simple extracción con disolvente acuoso básico y posterior reacidificación. Como regla general, los fenoles con sustituyentes electrófilos son más ácidos, puesto que estabilizan el ion fenóxido al deslocalizar la carga negativa [17].

El fenol se forma en la descomposición de muchos compuestos oxigenados. Se encuentra entre los productos de la descomposición natural de las proteínas y entre los productos de la descomposición térmica de la hulla y la madera.

Muchos aceites del cracking del petróleo contienen fenol y en la producción de aceites por hidrogenación de la hulla se forma fenol en cantidad considerable, además la descomposición de las cadenas laterales de un fenol sustituido (por ejemplo Cresol, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) bajo la influencia del hidrógeno da fenol. La acción de la mayoría de las sustancias oxidantes sobre el benceno puede dirigirse para formar fenol.

El proceso mayoritario utilizado industrialmente para la obtención del fenol es a partir de la oxidación del cumeno y posterior descomposición obteniéndose fenol y acetona. Otros procesos de obtención de fenol son a partir de la oxidación del tolueno o de la gasificación de carbón.

Químicamente, los clorofenoles se comportan como el fenol y una de las principales diferencias con respecto a los fenoles es la mayor acidez. Por su mayor acidez, los clorofenoles forman sales solubles con los carbonatos alcalinos. Esta propiedad se utiliza a veces para separar los fenoles clorados del fenol.

Los clorofenoles también son importantes para la industria debido a su gran espectro en las propiedades antimicrobiales y sus usos como fungicidas, herbicidas, insecticidas y alguicidas. Además son muy importantes en la síntesis orgánica como intermedios. Dentro de este gran grupo, sólo el 2-clorofenol es líquido a temperatura ambiente y tiene una mayor solubilidad en agua, de hecho en pequeñas cantidades da un sabor muy desagradable al agua.

La mayoría de los clorofenoles son sólidos a temperatura ambiente. Tienen un fuerte sabor y olor desagradable característico y es posible detectar el sabor de pequeñas cantidades de clorofenoles en agua.

2.3.1 Reactividad y estabilidad

Además de la acidez, la propiedad química más notable de los fenoles es la reactividad, bastante elevada del anillo en reacciones que implican sustitución electrofílica, siendo posible formar una gran variedad de complejos moleculares con bases orgánicas, con ácidos e iones orgánicos e inorgánicos [18].

El 2,4-dinitrofenol con el ácido nítrico concentrado produce una oxidación extensa convirtiendo el 2,4-dinitrofenol en 2,4,6-trinitrofenol, conocido como ácido pícrico. Con ácido nítrico diluido y a baja temperatura se obtienen dos monofenoles, el 2-nitrofenol y 4-nitrofenol.

2.3.2 Procedencia de los clorofenoles

Una cantidad importante de clorofenoles se obtienen a partir de los procesos de cloración, los cuales se producen en la purificación de aguas residuales de diferentes industrias químicas. En el producto técnico hay impurezas de otros isómeros del clorofenol u otros clorofenoles con más o menos cloro. Los clorofenoles más pesados están principalmente contaminados con policlorofenoxifenoles, clorodibenzoparadioxinas y clorodibenzofuranos. Mientras que por otro lado, también son consecuencia de la degradación de los pesticidas. También se forman a partir de compuestos fenólicos no clorados durante el proceso de cloración del agua.

Tabla 4. Producción a nivel mundial de clorofenoles

PRODUCCIÓN A NIVEL MUNDIAL	Toneladas/año
clorofenoles pesados (átomos de 4-5 cloro)	35-40.000
clorofenoles livianos (átomos de 1-3 cloro)	60.000

2.4 ASPECTOS AMBIENTALES DE LOS CLOROFENOLES

Los clorofenoles pueden pasar al medio ambiente durante su manufactura o uso como pesticidas.

Toxicidad en el ser humano: La toxicidad de los clorofenoles depende de el grado de cloración y la posición de los átomos de cloro. Los clorofenoles irritan los ojos y las vías respiratorias, además de que pueden ser adsorbidos por los pulmones, piel y tracto gastrointestinal. La administración de dosis tóxicas pueden afectar los órganos internos (hígado y médula ósea) y las dosis tóxicas de clorofenoles de 50-500 mg/Kg producen la muerte [19].

Comportamiento en el agua: En el medio acuático, los clorofenoles pueden disolverse y quedar libres o formando compuestos; también pueden adsorberse a las partículas en suspensión. Se eliminan principalmente por biodegradación, que es rápida cuando ya están presentes los microorganismos apropiados. Su degradación en el agua depende siempre del pH y de la temperatura.

Comportamiento en el aire: El Pentaclorofenol ingresa a la atmósfera debido a su volatilidad, la que se incrementa considerablemente con el aumento de la temperatura, pero depende igualmente de los posibles aditivos. Por ejemplo en la quema de madera tratada con Pentaclorofenol libera dibenzodioxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados, los cuales dependen de la naturaleza de la madera tratada.

Comportamiento en el suelo: La persistencia de los clorofenoles en el suelo depende de sus propiedades de adsorción-desorción y de la profundidad alcanzada por medio del agua subterránea.

Los fenoles y sus derivados constituyen un centro relevante de atención en el estudio de la contaminación del medio ambiente y los alimentos, debido a su toxicidad y a su persistencia. La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA), considera once compuestos fenólicos como contaminantes prioritarios: pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2, 4-diclorofenol, 2-clorofenol, fenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-dimetilfenol [20].

Por su alta toxicidad para los organismos vivos y para el ser humano, estos compuestos fenólicos han sido clasificados como contaminantes prioritarios y deben ser monitoreados continuamente, en ocasiones a muy bajos niveles de concentración (ppb), en diversas matrices [21].

Tabla 5. Clasificación de la EPA de los compuestos fenólicos por su toxicidad

Puesto	Nombre del compuesto
31	Pentaclorofenol
85	Fenol
94	2,4,6 triclorofenol
115	2,4,5 triclorofenol
121	2,4-dinitrofenol
130	2,4-dimetilfenol
243	2,4-diclorofenol
245	2-clorofenol

Tabla 6. Valor máximo aceptable para la calidad del agua potable (OPS/OMS)

Componentes	Valor máximo permisible(µg/L)
Bromoformo	100
Cloroformo	200
1,2-dicloroetano	30
1,1-dicloroetano	30
Pentaclorofenol	9.0
2,4,6-triclorofenol	200
2-Clorofenol	0.1
Fenol	2
2,3,4-triclorofenol	10

OPS (Organización Panamericana de la Salud), OMS (Organización Mundial de la Salud).

Tabla 7. Niveles guía de calidad de agua por la OMS para protección de vida acuática (Agua dulce).

Constituyente Peligroso	Nivel Guía (µg/L)
2-clorofenol	7
2,4-diclorofenol	4
Fenoles totales	1
Pentaclorofenoles	0.5
Triclorofenoles	18

2.5 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LOS TRICLOROFENOLES

2,4,6 TRICLOROFENOL $C_6H_2Cl_3OH$

Sólido color amarillo

Punto de fusión: 65-68 °C

Punto de ebullición: 246°C

Densidad relativa: 1.490

Solubilidad: en agua (0.1 g / 100ml), Metanol (525g/100g),

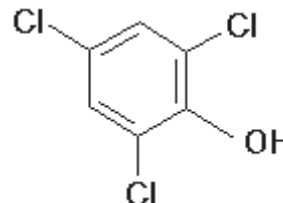
Acetona (500g/100g), Tolueno (100g/100g).

Peso molecular: 197.45 g/mol

Presión de vapor: 1 mmHg (76.5°C)

Estado físico: Polvo de color crema

Pka: 7.42



2,4,5 TRICLOROFENOL $C_6H_2Cl_3OH$

Estado físico: cristales incoloro, en masa sublimada con fuerte olor fenolico.

Punto de ebullición: 253 °C

Punto de fusión: 63-67°C

Densidad relativa (agua=1): 1.7

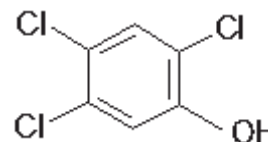
Solubilidad: en agua escasa (0.12g/100ml a 25°C) y soluble en metanol,éter.

Peso Molecular: 197.45 g/mol

Presión de vapor (Pa) a 25 °C: 2.9

Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow:4.1

Pka: 7.43



2,3,5 TRICLOROFENOL $C_6H_2Cl_3OH$

Sólido cristalino

Punto de ebullición: 350°C

Punto de fusión: 62°C

Solubilidad: Soluble en metanol

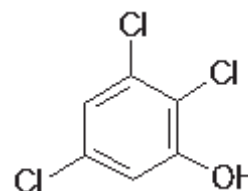
Peso molecular: 197.4 g/mol

Densidad relativa de vapor (aire=1): 6.8

Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire=1): 1.0

Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow=4.56

Pka: 7.36



3-CLOROFENOL C_6H_4ClOH

Estado físico, aspecto: Cristales incoloros de olor característico.

Punto de ebullición a 101.3 Kpa= 214°C

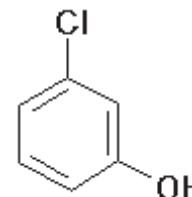
Punto de fusión: 33°C

Densidad relativa (agua=1): 1.268

Peso molecular: 128.56 g/mol

Solubilidad: en agua (2.6 g/100g H₂O) y soluble en Metanol

PKa=8.85



2,3,4 TRICLOROFENOL $C_6H_2Cl_3OH$

Estado físico: Escamas de color blanco

Punto de ebullición: 248-250°C

Punto de fusión: 79-81°C

Densidad relativa (agua=1) : 1.5

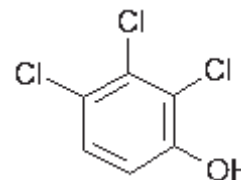
Solubilidad: Soluble en metanol

Peso molecular: 197.4 g/mol

Densidad relativa de vapor (aire=1) : 6.82

Punto de inflamación: 62 °C

Pka: 7.65

**FENOL C_6H_5OH**

Color: Blanco

Fase: Sólido cristalino

Punto de fusión: 41.5°C

Punto de ebullición: 182°C

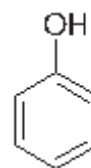
Gravedad Específica: 1.071

Presión de vapor: 0.4mm a 20°C

Densidad de vapor: 3.24

Solubilidad: 9.3 g/100ml de H_2O (20°C), éter, cloroformo, glicerina.

pKa= 9.99



2.6 APLICACIONES DE LOS TRICLOROFENOLES UTILIZADOS

2,4,5 Triclorofenol: Se usa como materia prima para la síntesis del ácido 2-4-5 Triclorofenoxiacético, un herbicida también conocido como agente naranja y ampliamente utilizado como defoliante por el ejército de Estados Unidos durante la guerra de Vietnam, varias preparaciones de 2-4-5 Triclorofenoxiacético se han usado enteramente como herbicidas en cosechas y campos de alimentos. También se usa para producir hexaclorofenol (usado para matar bacterias), fungicida, alguicida, germicida para la preservación de madera contrachapada, bactericida [22,23].

2,4,6 Triclorofenol: Se usa para producir 2-3-4-6 tetraclorofenol y pentaclorofenol, es germicida, bactericida, conservador de madera, cuero, goma y defoliante, agente anti-moho para la industria textil, insecticida, fungicida y intermediario para la síntesis de otros alguicidas e insecticidas y como ingrediente de los jabones germicidas.

2,3,5 Triclorofenol: Se usa como intermediario para los productos agroquímicos y otros compuestos, para la formulación de fungicidas, bactericidas y alguicidas.

2,3,4 Triclorofenol: Se usa como intermediario para los productos agroquímicos y otros compuestos, para la formulación de fungicidas, bactericidas y alguicidas.

3- Clorofenol: Se usa como intermediario para los productos agroquímicos y otros compuestos, para la formulación de fungicidas, bactericidas y alguicidas.

Fenol: Se usa en la fabricación de explosivos , fertilizantes, pinturas, removedores de pintura, caucho, asbesto, conservador de madera, resinas sintéticas, textiles, drogas, fármacos, perfumes, baquelita. Es desinfectante de petróleo, piel, papel, jabón, juguetes y agricultura.

2.7 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, la fase estacionaria, de gran área superficial y la fase móvil que se hace pasar a lo largo de la fase estacionaria. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra, que se representa por una constante de equilibrio de la siguiente manera:

$$S_m \longleftrightarrow S_{st} \quad K = \frac{[S]_{st}}{[S]_m}$$

donde:

S_m = soluto en la fase móvil.

S_{st} = Solute en la fase estacionaria.

K = Constante de equilibrio

$[S]_m$ = Concentración del soluto en la fase móvil.

$[S]_{st}$ = Concentración del soluto en la fase estacionaria

La cromatografía como técnica analítica instrumental es capaz de proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de la composición de la mezcla. Además, las especies separadas se pueden caracterizar empleando los detectores apropiados. Cuando la fase móvil es un gas, se llama cromatografía de gases; si es líquida se denomina cromatografía de líquidos.

2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS MÁS RELEVANTES PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

Con relación a los métodos analíticos más relevantes para la determinación de los fenoles, destacan la espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y cromatografía de gases.

2.8.1 Métodos espectrofotométricos en ultravioleta-visible (uv-vis)

Los fenoles por su reactividad química pueden tener una gran variedad de reacciones de interés para su análisis por espectrofotometría. En general, mediante la espectrofotometría se determina la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra, pero sin hacer distinción entre los diferentes tipos de fenoles.

El desarrollo del color, la sensibilidad, la reactividad y la longitud de onda del máximo de absorción, dependen de factores tales como el pH, temperatura, disolvente, reactivo empleado, naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo aromático [24].

Los métodos espectrofotométricos en la zona del ultravioleta se basan en el desplazamiento batocrómico que tiene la longitud de onda máxima (λ_{maxima}) de absorción de los fenoles en disolución alcalina, lo que permite la eliminación de muchas interferencias [25]. Pero la determinación de fenoles al nivel de $\mu\text{g/L}$ por espectrofotometría ultravioleta-visible de forma directa es difícil debido a la baja absortividad molar de estos compuestos.

2.8.2 Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos permiten la determinación individual de cada fenol y en general son más sensibles y selectivos que la espectrofotometría ultravioleta-visible. Estos métodos cromatográficos tienen varias formas de efectuarse de acuerdo a ciertos parámetros como fase móvil, fase estacionaria, el propio fenómeno que ocurre en la columna.

Dentro de los métodos cromatográficos se utilizan con más frecuencia la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y cromatografía de gases (CG).

La elección del método cromatográfico más adecuado para el análisis de una muestra de agua depende principalmente de la volatilidad, estabilidad térmica y la naturaleza química de los analitos de interés de la muestra.

2.8.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución (clar)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica analítica precisa, de separación de mezclas de compuestos orgánicos e inorgánicos que se encuentran presentes a diferentes niveles de concentración. Es un método sensible, selectivo, preciso y exacto de gran aplicación en el análisis de trazas de compuestos.

Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) la cual es un líquido o mezcla de varios líquidos que fluye permanente durante el análisis. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico que se encuentran disponibles en el mercado.

Los intercambiadores iónicos, son matrices sólidas que contienen sitios activos (también llamados grupos ionogénicos) con carga electrostática (positiva o negativa), entre estos se puede usar, los de resinas de poliestireno (polímeros orgánicos), sílica porosa, óxidos inorgánicos y intercambiadores peliculares, de esta forma, la muestra queda retenida sobre el soporte sólido (fase estacionaria) por afinidad electrostática.

Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, lo que provocará su separación. Las sustancias que permanecen más tiempo libres en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el fluir de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir. Éste es el principio fundamental de la cromatografía. Un ejemplo notable es la cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) no está limitada por la volatilidad o estabilidad térmica de las muestras y los compuestos que pueden estudiarse con esta metodología incluyen especies iónicas, macromoleculares, polímeros, productos lábiles naturales y compuestos polifuncionales de pesos moleculares entre 10^2 y 10^4 daltones [26].

La elución de la muestra puede efectuarse de dos maneras: a) Isocrática, cuando no se modifica la composición de la fase móvil durante el análisis y b) con gradiente, cuando la composición de la fase móvil varía durante una corrida. En este caso se utilizan dos o más disolventes de diferente polaridad y se programa con cambios en su proporción, en forma continua o escalonada, según la naturaleza de la muestra.

La cromatografía líquida de alta resolución ha sido ampliamente utilizada para el análisis de compuestos fenólicos. La mayoría de las aplicaciones se han llevado a cabo para la determinación de fenoles en agua. Pero, hay otras aplicaciones en muestras como en madera, residuo de explosivo y orina humana [27].

Se han utilizado varias fases estacionarias, sin embargo las que han dado mejores resultados son las fases ligadas en cromatografía de fase inversa y otras poco utilizadas de fase normal.

Con relación a las fases móviles en sistemas de elución en isocrático o gradiente, las más usadas son las que utilizan el metanol y/o acetonitrilo a los cuales se les adiciona disoluciones reguladoras acuosas, dado el carácter ácido de los fenoles, ya que la utilización de disoluciones reguladoras disminuyen el ensanchamiento de las bandas. Algunos autores han utilizado también la formación de pares iónicos [28,29].

La selectividad aportada por esta técnica es mayor que la de cromatografía de gases, debido a que los dos parámetros que afectan la separación (fase estacionaria y fase móvil) comprenden diversos materiales que varían en un amplio intervalo de polaridades y funciones químicas.

La instrumentación en CLAR de un sistema cromatográfico son:

- recipiente(s) para la fase móvil
- bomba para proporcionar presión a la fase móvil
- inyector para la introducción de la muestra
- columna cromatográfica
- detector
- sistema para el tratamiento de datos y registrador

Con relación a los detectores, el más utilizado es el detector ultravioleta-visible, por su respuesta selectiva a 254 nm y 280 nm [30].

Tabla 8. Longitudes de onda mínima de trabajo en la zona de UV para disolventes frecuentes en CLAR.

DISOLVENTE	LONGITUD DE ONDA (nm)
Éter de petróleo	210
Tetracloruro de carbono	265
Benceno	230
Cloroformo	245
Tetrahidrofurano	220
Acetona	330
Acetato de etilo	260
Acetonitrilo	210
Metanol	210
Agua	190

2.8.2.2 Cromatografía de gases (cg)

La cromatografía de gases es una técnica bastante utilizada para el análisis de los fenoles, debido a la eficacia en la separación, rapidez del análisis y sensibilidad. Aunque la mayoría de los fenoles presentan alta polaridad y baja presión de vapor,

circunstancias que dificultan su análisis, hay muchos métodos para su determinación por cromatografía de gases [31].

Los fenoles más volátiles y de bajo peso molecular pueden ser separados por cromatografía de gases sin pretratamiento. Sin embargo, para la separación de los polifenoles se requiere la formación de un derivado. Debido a las bajas concentraciones en que se encuentran los fenoles en distintas muestras, principalmente en agua, se utiliza para su determinación principalmente la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida. Actualmente se ha comenzado a utilizar la microextracción en fase sólida para estos tipos de compuestos.

Las características cromatográficas de los fenoles se pueden mejorar haciendo un paso previo a la detección, mediante la formación de derivados volátiles. Los derivados presentan una menor polaridad y reactividad, por eso tienen mejores características cromatográficas que los propios fenoles. La acetilación con anhídrido acético es el tipo de derivatización más usada para los fenoles. Pero también se utilizan otros reactivos, cloruro de pentafluorobenzoilo, bromuro de pentafluorobenzoilo y derivados de éteres.

Actualmente la mayoría de los métodos utilizan columnas capilares, principalmente las de sílice fundida que poseen mayor inercia química, permitiendo separar los fenoles más ácidos. Otros métodos utilizan columnas empaquetadas.

2.8.2.3 Otros métodos cromatográficos

Además de la cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases, se utilizan la cromatografía de fluidos supercríticos para la determinación de fenoles. La cromatografía de fluidos supercríticos es una técnica cromatográfica que utiliza CO₂ supercrítico como fase móvil. Un fluido supercrítico posee propiedades intermedias entre las de un gas y un líquido.

2.9 DIFERENTES MÉTODOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Existe un buen número de métodos de cromatografía de líquidos que son utilizados en moléculas con propiedades determinadas; algunas veces se combinan varios métodos para lograr una separación adecuada y con la mira de aumentar la selectividad y el mejor rendimiento de la columna.

Autores como Willard en 1990 así como Vera y Thibert, han agrupado los métodos de una manera que ofrece una alternativa conveniente queda una guía para escoger un modo cromatográfico específico, pero sólo la práctica permite tener la flexibilidad de combinar métodos e interpretar correctamente los resultados.

Para muestras pequeñas con peso molecular >2000 y compuestos solubles en agua se prefiere cromatografía de exclusión con la fase móvil acuosa; para compuestos no solubles en agua se aplica de igual manera cromatografía de exclusión, pero con fase móvil orgánica.

Muestra insoluble en agua, carácter alifático o aromático y peso molecular menor que 2000, se recomienda la cromatografía de adsorción líquido-sólido o líquido-líquido.

Para separar isómeros: GLSC (Cromatografía Gas- Líquido de Absorción).

Para separar homólogos: LLC. (Cromatografía líquido-líquido).

Grupos funcionales que forman fuertes enlaces de hidrógeno o sea muestras con polaridad intermedia y solubles en disolventes orgánicos de baja polaridad: LLC. (Cromatografía líquido-líquido).

Moléculas con grupos iónicos o ionizables solubles en agua y pesos moleculares menores de 2000: IEC. (Cromatografía de Intercambio Iónico) o IPC (de pares de iones).

Se emplea EC, cromatografía de exclusión o permeación en gel cuando la molécula es más pesada que 2000 de peso molecular.

La cromatografía de afinidad se emplea cuando existe una especificidad de una sustancia por otra, lo cual sucede mucho en las especies biológicas.

- Cromatografía de adsorción.
- Cromatografía con fase enlazada.

La cromatografía de fase enlazada se caracteriza porque la fase estacionaria esta químicamente unida a la fase móvil.

Las partículas de sílica gel sufren modificaciones para reemplazar sus grupos silanoles activos polares, por grupos funcionales determinados como: octadecilsilano (ODC o C₁₈), octilsilano (C₈), fenilo, ciano, amino, diol, nitro, etc.

Este tipo de cromatografía se ha desarrollado con evidentes logros en la resolución, la reproducibilidad y la rapidez. El 80% de las separaciones cromatográficas emplean fase enlazada y de éstas, la mayoría son de fase reversa.

2.10 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA

En la cromatografía en fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias, estando formada la más común por grupos no polares unidos a la sílice [32]; la cromatografía de fase reversa (RP) emplea un empaque enlazado hidrofóbico de diferentes longitudes de cadena, 2, 8 ó 18 átomos de carbono como fase estacionaria y una fase móvil constituida por mezclas de agua con algún disolvente orgánico y puede también adicionarse de amortiguadores o sales. De ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es la más común.

Las sustancias polares muestran preferencia por la fase móvil y son las primeras en eluir, mientras que las moléculas de naturaleza apolar tardan más en eluir. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria

apolar. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también frecuentemente muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente, para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente. De manera que la retención de los solutos en este tipo de sistemas, se debe a que la superficie hidrocarbonada de la molécula del soluto, así como las moléculas hidrocarbonadas de la fase estacionaria experimentan un efecto de repulsión hacia el eluyente polar, de modo que para disminuir la superficie hidrocarbonada en contacto con la fase móvil, se produce una asociación entre el soluto y las cadenas de la fase estacionaria. De esta manera, la retención no es debida a una atracción entre el soluto y la fase estacionaria, sino a la repulsión que ambas experimentan hacia el eluyente y que las conduce a asociarse. Se tiene entonces que la retención depende fundamentalmente de las siguientes variables:

- Concentración y longitud de las cadenas hidrocarbonadas en la fase estacionaria
- Superficie hidrocarbonada en el soluto
- Polaridad de la mezcla que constituye la fase móvil

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de los métodos utilizan soluciones amortiguadoras o tampón para controlar el valor de el pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta para asociarse con las moléculas del compuesto y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto.

Ajustando el pH del lado ácido se reduce la ionización de los ácidos, lo que permite que éstos se separen con técnicas de fase inversa. A este método se le llama supresión iónica y es muy útil para ácidos y bases débiles en el intervalo de pH de 2-8. Los reguladores de fosfato pueden usarse para un intervalo amplio de pH. A valores bajos se suele usar ácido perclórico. La inestabilidad general de las fases de sílice enlazada impide el uso de eluyentes alcalinos.

Cuando se preparan gradientes, éstos se generan con una disminución constante de la polaridad del eluyente, es decir, se aumenta la proporción del solvente orgánico logrando así un incremento continuo en la fuerza de la fase móvil.

En estas condiciones, por fase reversa se pueden concentrar sustancias traza, empleando disolventes de inyección con gran proporción de agua que en este caso es débil a la elución; después se eluyen de la columna generalmente por el empleo de un gradiente.

Las ventajas de esta modalidad cromatográfica se resumen de esta manera:

- Los compuestos no iónicos e ionizables se pueden separar en la misma columna y con la misma fase móvil.
- La adsorción irreversible casi no ocurre.
- La fuerza de atracción entre la superficie no polar y el soluto es débil.
- La utilidad del agua como fase móvil
- Un modificador orgánico muy frecuente es el metanol.
- Se puede predecir el orden de elución en función de la hidrofobicidad del analito.
- El sistema requiere poco tiempo para llegar al equilibrio, al hacer un cambio de fase móvil.

La simplicidad y la reproducibilidad de la cromatografía de fase reversa con fases enlazadas, hacen que este método sea muy atractivo para la química clínica, en el área farmacéutica y en el análisis cuantitativo de drogas, el cual es uno de los campos de aplicación más importante.

En fase reversa se emplean muy frecuente, además del agua y del metanol, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano que combinados modifican la selectividad, es decir, modifican la velocidad de separación de los compuestos [33]. Esta selectividad también se ve afectada por el PH, los aditivos y por el modificador.

Este método es muy empleado en diversos sistemas sobre todo cuando no tienen grupos que establezcan puentes de hidrógeno y sean aromáticos o alifáticos o series de diferente longitud de cadena.

El segundo tipo de fase estacionaria usada en la cromatografía de fase reversa está compuesto de partículas esféricas de polímero orgánico. Un polímero típico es una resina compuesta de poliestireno y divinilbenceno. Los componentes del divinilbenceno forman enlaces entre las cadenas del poliestireno (enlaces cruzados). Los enlaces cruzados producen un reforzamiento físico del polímero; de manera que una mayor densidad de enlaces cruzados se asocia con un material rígido. La rigidez es necesaria para resistir las deformaciones bajo presión.

Las fases estacionarias de copolímeros de estireno-divinilbenceno funcionan en todo rango de pH, lo que los hace muy versátiles y funcionan como los de fase reversa.

La cromatografía en fase reversa es relativamente popular ya que en las separaciones en fase reversa los picos tienden a ser agudos y simétricos y el equilibrio en las reacciones de adsorción-desorción tiende a ser rápido.

Tabla 9. Aplicaciones de la cromatografía líquida en fase reversa

Ácidos carboxílicos	Carbohidratos
Aminas	Corticosteoroides
Aflatoxinas	Diuréticos
Micotoxinas	Glicósidos cardíacos
Alcaloides	Pesticidas organofosforados
Analgésicos	Pesticidas organoclorados
Anticonvulsivos	Conservadores
Barbituratos	Hormonas
Benzodiazepinas	Sulfonamidas
Carbamatos	Vitaminas

Tabla 10. Características de la cromatografía en fase reversa

FASE	REVERSA
Polaridad del relleno	BAJA
Polaridad del disolvente	ALTA
Orden de Elución	Primero el más polar
Efecto del incremento de polaridad	Aumenta los tiempos de retención

del solvente.	
---------------	--

2.10.1 Características de los disolventes de mayor empleo en cromatografía de líquidos de fase reversa

Agua: Es el disolvente más utilizado en cromatografía de líquidos de alta resolución, como tal, encuentra sus limitaciones en la presencia de sustancias orgánicas como los ftalatos, que no se eliminan por tratamiento de desionización y destilación y en este caso las impurezas pueden actuar como verdaderos recubrimientos de la columna modificando su selectividad.

Metanol: Su baja viscosidad lo hace un solvente de elección para CLAR en fase reversa. Tiene un alto poder disolvente, y es el mas barato por su facilidad industrial de purificación, sus desventajas son la afinidad al oxígeno y la generación de presiones mayores que el acetonitrilo.

Acetonitrilo: Sus constantes físicas son adecuadas pero una pequeña desventaja reside en la variación de viscosidad al adicionarse en cantidades altas al agua. Por ello, pueden surgir cambios de presión al realizar sistemas de elución en gradientes y error de la precisión de los datos.

Tetrahidrofurano: Menos polar que el acetonitrilo y que el metanol, al emplearse en menores proporciones que estos, consigue retenciones similares en fase reversa. Como principal desventaja, común a todos los éteres, muestra la posibilidad de formar peróxidos bajo diferentes condiciones experimentales. No se puede purificar en exceso, por un posible peligro de explosión y tras permanecer en contacto con el aire, su absorbancia en la región UV aumenta significativamente a causa de formar peróxidos.

2.11 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE FENOLES

Independientemente, del método cromatográfico utilizado, cuando la muestra es demasiado compleja, o bien, cuando la concentración de los analitos de interés es tan baja que su detección se dificulta, se requiere de una etapa previa de limpieza o preconcentración antes de su separación cromatográfica [34].

Debido a que los fenoles suelen estar presentes en el agua a niveles traza por lo que generalmente no es posible determinar su concentración mediante una medida instrumental directa y se hace necesario utilizar alguna técnica de preconcentración como etapa previa al análisis de estos compuestos. De ésta manera se consigue de una forma indirecta aumentar la sensibilidad del método y además permite eliminar interferentes, obteniéndose un aumento de la selectividad en la determinación de los analitos.

Los métodos más utilizados para la extracción y preconcentración de fenoles son la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida, la extracción supercrítica y la destilación.

2.11.1 Método de extracción en fase sólida

Esta técnica de preconcentración ha tenido una gran aceptación por ser rápida y eficiente para acoplarse en línea con la cromatografía de líquidos de alta resolución de manera que todo el proceso se puede llevar a cabo de forma automatizada. La extracción en Fase Sólida (EFS) es un método de preparación de la muestra que consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartucho.

En la extracción en fase sólida los analitos tienen afinidad por una fase sólida o por una fase líquida ligada a un soporte sólido y los componentes de la muestra se unen por interacciones débiles. Los compuestos retenidos son eluidos con un disolvente orgánico. La extracción en fase sólida fue introducida en 1970 para minimizar algunas desventajas de la extracción líquido-líquido: tiempo requerido, gran volumen de muestra, formación de emulsiones, grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos y la necesidad de disolventes ultrapuros. Hay muchos procedimientos para preconcentrar, pero la adsorción sobre sólidos es probablemente uno de los más usuales y populares.

En la adsorción, la muestra acuosa se hace pasar a través de una columna que contiene un adsorbente y los compuestos orgánicos retenidos son eluidos posteriormente con un disolvente orgánico.

La preconcentración de los analitos de una muestra por adsorción es un proceso físico en el cual existe una fase sólida y una fase líquida. La fase sólida presenta más afinidad por el analito que por el disolvente, o sea, cuando la disolución pasa a través del lecho adsorbente, éste se va concentrando en su superficie, mientras que los otros componentes de la disolución pasan sin absorberse.

Los adsorbentes más usados son los que contienen, carbón, polímeros porosos y materiales de fase ligada [35,36]. Hay dos tipos de carbón frecuentemente utilizados como adsorbentes: carbón activado y negro de carbón grafitizado.

El volumen de la fase sólida suele ser mucho más pequeño que el de la solución que contiene el analito: la fase sólida puede ser desde una superficie de pocos centímetros de diámetro de un disco de papel filtro químicamente modificado, hasta una pequeña columna empacada de 1 a 35 ml; un cartucho empacado parcialmente con pequeñas partículas adsorbentes.

La extracción en fase solida tiene lugar mediante mecanismos de adsorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas. La retención y elución obedece o bien a una partición o a los principios de la cromatografía de líquidos de fase reversa, fase normal e intercambio iónico. La EFS puede considerarse como una extracción líquido-sólido aunque algunos de los mecanismos que involucran la retención obedezcan a fenómenos diferentes.

Las técnicas de preconcentración por EFS se efectúan de dos modos: fuera de línea (en diferido) y en línea; ambas se usan en el monitoreo de sustancias contaminantes presentes en ríos y aguas residuales. La aplicación de EFS en línea requiere darle empleo de precolumnas de acero inoxidable empacadas con diversos adsorbentes de granulometría muy fina (aproximadamente 10 μm) que comprenden principalmente materiales polares, poco polares y de intercambio iónico en los que se extraen y concentran los analitos de interés.

Posteriormente los solutos adsorbidos son eluidos directamente desde la precolumna a la columna analítica mediante una válvula de conmutación, para su detección y cuantificación. Debido a que no hay manipulación externa de la muestra entre las etapas de preconcentración y análisis se obtienen resultados más exactos en el análisis de trazas. Las superficies de fase sólida se clasifican por un conjunto conveniente de atributos químicos en polares o no polares, ácidas, neutras o básicas, hidrofílicas o hidrofóbicas y catiónicas o aniónicas (dependiendo si enlazan cationes o aniones, respectivamente).

3 CAPITULO DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 METODOLOGÍA

La mezcla de triclorofenoles (estándar) que se preparó está constituida por 3-clorofenol y 4 solutos(isómeros de posición) a una concentración de 20 ppm.: 3-CF, 2,3,5- TCF ; 2,4,5-TCF ; 2,4,6-TCF ; 2,3,4-TCF.

La caracterización de los compuestos triclorofenoles formados por cloración de trazas de 3-clorofenol se realiza mediante un sistema en línea de Extracción en Fase Sólida (EFS) con la cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), por lo cual la primera parte del trabajo es la implementación de la metodología para lograr este propósito.

La Extracción en Fase Sólida es un método de preparación de muestras acuosas que consiste en extracción y concentración de los fenoles y elución y análisis.

3.1.1 EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS FENOLES

Este paso se efectúa en una precolumna de acero inoxidable (20 x 2 mm D.I.) empacada con un adsorbente polimérico del tipo estireno-divinilbenceno. La muestra de fenoles es acidificada a pH=2 para que los solutos queden retenidos en su forma molecular por el adsorbente apolar. Una bomba isocrática permite pasar la muestra a través de la precolumna, esta última se encuentra montada en una válvula de conmutación. El volumen de la muestra que se preconcentra en la precolumna es de 25 ml y se determinó mediante varios experimentos. Para los triclorofenoles es necesario agregar metanol para evitar pérdidas por adsorción.

El volumen de muestra que se carga en la precolumna resulta de un compromiso entre sensibilidad y exactitud. A mayor volumen, la concentración de solutos que puede analizarse es menor (mayor sensibilidad), pero el % de recobro también disminuye (menor exactitud), en este trabajo se optó por escoger un volumen de carga de 25 ml, con el cual ninguno de los analitos se fuga de la precolumna.

3.1.2 Elución y análisis

El análisis de la muestra concentrada y purificada se realiza acoplado en línea la precolumna polimérica (una segunda columna anterior a la columna analítica) con una columna analítica de fase reversa C-18. Este acoplamiento se lleva a cabo simplemente cambiando la posición de la válvula de conmutación. La finalidad de estas precolumnas es retirar las impurezas del disolvente y capturar los componentes de la muestra fuertemente retenidos, impidiendo así la contaminación gradual de las columnas analíticas. La separación de los solutos de la muestra se realiza por la CLAR.

3.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Columna analítica: 150 x 4.6 mm D.I., empacada con una fase Hypersil (C-18) de 5 μm .

Elución isocrática: Composición constante de la fase móvil durante la corrida.

Fase móvil: Ternaria

Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa pH=4.5 (42:8:50) v/v,conteniendo CH_3COOH - CH_3COONa 0.01 M.

Detección: Absorción UV a 280 nm.

Flujo: 1 ml/min, Temperatura: ambiente

3.3 REACCIÓN DE CLORACIÓN DEL 3-CLOROFENOL

La reacción de cloración del 3-clorofenol se estudió en condiciones similares a las empleadas en el tratamiento de depuración del agua (1 ppm de cloro, 50 ppb de 3-clorofenol, pH=7) y en agua sin amortiguar (agua pura) y tiempos de contacto de 10,30,60,120 y 180 min.

En los diversos experimentos realizados, la reacción del 3-clorofenol con el cloro se llevó a cabo en una serie de recipientes aforados de 50 ml, en donde se colocaron: 100 μl de Cl_2 de 500 ppm, 67 μl de 3-clorofenol de 37.5ppm tanto en agua sin amortiguar y en fosfatos de pH=7 y aforamos. Cada uno de los cuales fue analizado a un tiempo dado empleando el método analítico en línea desarrollado de EFS-CLAR.

Previamente se efectuaron diversos ensayos para encontrar un método efectivo para detener la reacción en los diferentes recipientes al tiempo establecido. El uso del sulfito de sodio (Na_2SO_3) como agente reductor para consumir el cloro residual proporcionó buenos resultados (se colocaron 600 μL del sulfito a la reacción).

Las reacciones de cloración se hicieron para saber que compuestos triclorados se forman y a que concentraciones a los diferentes tiempos de estudio tanto en $\text{pH}=7$ y en agua nanopura.

3.4 EQUIPO Y ACCESORIOS UTILIZADOS

Cromatógrafo de líquidos marca Perkin Elmer el cual esta constituido por las siguientes partes:

- Inyector de rizo Rheodyne BIO-7125, con loop de 20 μL de Titanio.
- Bomba binaria Serie 200. Rango de flujo de 0.01-10 ml/min, presión máxima de operación de hasta 6200 psi en todo el rango de flujo. Opera en dos modos: elución isocrática y gradiente de disolventes.
- Detector UV/VIS programable de longitud de onda variable, marca Perkin Elmer Modelo 785 A de doble haz, indicador de absorbancia de seis dígitos y con un intervalo de operación de 190 a 700 nm. Para este trabajo la longitud de onda utilizada es de 280 nm.
- Interfase NCI-901 para almacenamiento de datos.
- Equipo de cómputo marca COMPAQ: Software Turbochrom PRO SI, para coleccionar y procesar los datos cromatográficos provenientes del detector. Serie numero 0699PR0059.

3.4.1 Otros equipos

- Destilador marca FELISA, voltaje de operación 120 V.
- Sistema desionizador para obtener agua nanopura marca Barnstead Thermolyne modelo D-4641-5028.
- Sistema de filtración de disolventes Millipore modelo OM037.
- Bomba de vacío marca SIEMENS, motor electrónico de corriente alterna monofásico, rpm 1735.

- Sistema de ultrasonido para desgasificar las soluciones. Marca Sonicor, modelo SC-100TH.
- Potenciómetro Orion Modelo 520, equipado con un electrodo combinado vidrio calomel (Ag/AgCl) marca Orion Modelo 91-02.
- Balanza analítica Sartorius.
- Parrilla de calentamiento Thermolyne con agitador
- Equipo de ultrasonido de 3L con timer y calefacción marca Sonicor modelo SC-100TH.
- Bomba marca Eldex, modelo CC-100-S que opera en un rango de flujo de 0.01-7.5 mL/min.
- Columna analítica (150x4.6 mm D.I.) C-18, TermoQuest Hypersil División ODS de 5µm.
- Precolumna polimérica EFS (20X2 mm D.I.) empacada con fase reversa con un copolímero de estireno-divinilbenceno, PLRP-S 100A de 10-15µm.

3.4.2 Otros materiales

- Membranas de nylon para filtración marca Millipore de 47 mm con poro de 0.20µm.
- Micropipetas Marca Brand de capacidades: 5-50, 25-250 µL y 100-1000 µL.
- Jeringa de vidrio marca Hamilton de punta plana, Modelo 80600 con capacidad de 0-100 µL.
- Pipetas pasteur
- Frascos ámbar de vidrio Pirex de 100 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- Bureta Pirex de 25 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10ml.

3.5 ESTÁNDARES

- 3-clorofenol de 98.4 % de pureza, Chem Service, Inc.USA
- 2,4,5-triclorofenol de 99.3 % de pureza, Chem Service, Inc.USA
- 2,3,5-triclorofenol de 98.2% de pureza, Chem Service, Inc.USA
- 2,3,4-triclorofenol de 99% de pureza, Chem Service, Inc.USA
- 2,4,6-triclorofenol de 99% de pureza, Chem Service, Inc.USA

3.6 REACTIVOS

- Solución de cloro de 500 ppm
- acético glacial de 99.7% de pureza, Baker, USA.
- Ácido perclórico de 70-72% de pureza, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.
- Ácido fórmico de 98% de pureza, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.
- Hidróxido de sodio, 98% de pureza, Sigma Aldrich.
- Hipoclorito de sodio, 6% de cloro libre disponible, Sigma Aldrich.
- Yodato de potasio de 99% de pureza, Sigma Aldrich.
- Tiosulfato de sodio de 99% de pureza, Sigma Aldrich.
- Sulfito de sodio de 99% de pureza, Sigma Aldrich.
- Almidón.
- Fosfato diácido de potasio de 99% de pureza, Baker.
- Fosfato ácido de potasio trihidratado de 99% de pureza, Baker
- Yoduro de mercurio (II) de 99% de pureza, Baker.
- Yoduro de potasio de 99% de pureza, Sigma Aldrich.
- Acetato de sodio de 99% de pureza, Baker.

3.7 DISOLVENTES

- Agua nanopura (agua desionizada o pura)
- Metanol para HPLC, MERCK KGaA
- Acetonitrilo para HPLC, PROLABO

3.8 DISOLUCIONES ESTÁNDAR

- Tiosulfato de sodio 0.1N
- Tiosulfato de sodio 0.01N

3.9 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

a) Disoluciones Estándar de clorofenoles

Se preparó un estándar de 20 ppm de cada clorofenol en 50% acetonitrilo (CH_3CN) ó (ACN).

Se preparó un buffer de fosfatos de pH=7 de concentración 0.1 M ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$).

Se prepara la disolución de 1 ppm (partes por millón) de cloro a partir del cloro de 500ppm. El reactivo de NaClO que contiene 6 % de cloro libre se normaliza cada 15 días.

Se prepara una fase móvil de metanol (MeOH)-acetonitrilo (ACN)- fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v.

Preparación de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Pesar aproximadamente 2.6g de tiosulfato de sodio, disolver el agua recién hervida y fría, añadir 0.1ml de cloroformo (o Na_2CO_3) para neutralizar posibles iones hidrógeno y evitar el desarrollo de microorganismos, aforar con la misma agua a 100ml. Guardar la disolución en frasco color ámbar.

Preparación de la disolución de KIO_3 .

Pesar 3.5667g de KIO_3 (patrón primario) y aforar a un litro con agua destilada para preparar una disolución 0.1N.

Preparación de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01N.

Se prepara por dilución de la disolución concentrada de 0.1N y se valora con una disolución de KIO_3 de la misma concentración (0.01N).

b) Disoluciones Ácidas

Disolución de ácido acético 1M.

Disolución de ácido fórmico 1M.

Disolución de ácido perclórico 10^{-2}M a partir de ácido perclórico 1M.

4 CAPITULO ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización de los compuestos formados (triclorofenoles) durante la cloración del 3-CF en base a las diferentes condiciones experimentales estudiadas, se realiza mediante la CLAR, los datos proporcionados por la propia separación cromatográfica de los fenoles y la respuesta del detector UV son primordiales para determinar la cantidad y el tipo de triclorofenoles que se forman.

4.1 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La mezcla de clorofenoles se inyecta en el sistema en línea precolumna-columna analítica ya que ambas contribuyen a la retención y forma de los picos de los analitos. La composición de la fase móvil debe ser tal que permita la desorción cuantitativa de los analitos de la precolumna, su transferencia eficiente hacia la columna analítica y su separación cromatográfica.

Para lograr buena resolución y eficiencia en la separación de la mezcla de los triclorofenoles, la optimización de condiciones debe considerar la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil, pH, la concentración y naturaleza del buffer. Además, la fase móvil debe ser compatible con el detector UV.

Estos compuestos presentan propiedades químicas muy parecidas ya que son isómeros de posición y tienen propiedades ácido-base: $\text{ArOH} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{ArO}^-$

Acido Base

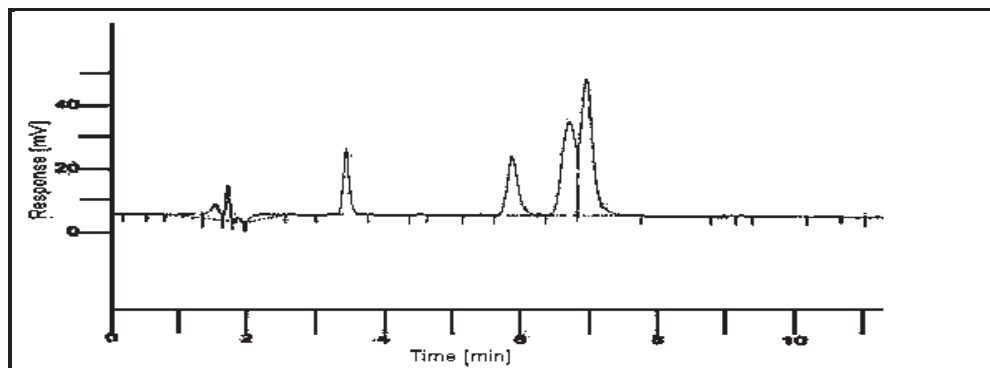
su separación deberá basarse en la selectividad de esta técnica mediante cambios en la composición de la fase móvil (pH, naturaleza y contenido de disolventes orgánicos).

Se llevo a cabo la separación de los fenoles utilizando una precolumna con fase de un copolímero de estireno-divinilbenceno de naturaleza no polar (PRP) y una columna analítica de C-18 (apolar) con cromatografía líquida en fase reversa.

Los ensayos efectuados para lograr la separación de los fenoles realizados fueron los siguientes:

CROMATOGRAMA 1

- Fase móvil: Acetonitrilo – Fase acuosa (pH=4)



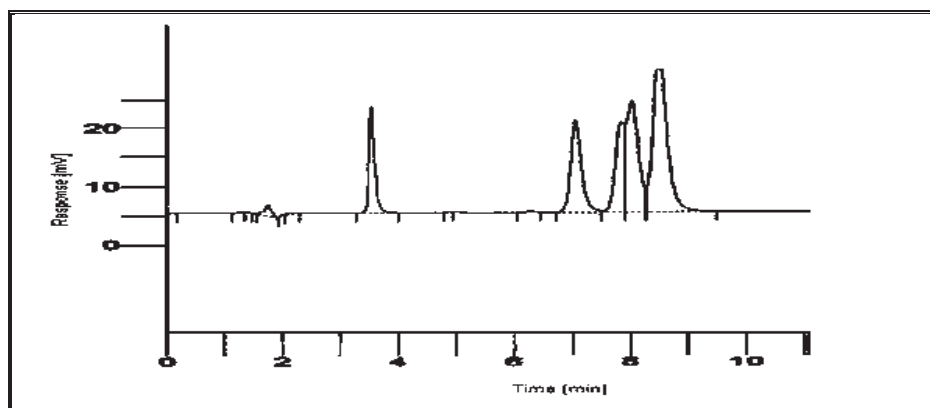
Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Fase acuosa (pH=4) 50:50 v/v conteniendo HCOOH-HCOONa 0.0 1M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; $\lambda = 280$ nm, $S = 0.01$ AUFS, $\tau = 0.5$ s.

Se observan solamente 4 picos por lo que la mezcla de fenoles no se separa y por ello es necesario modificar la composición de la fase móvil, añadiendo metanol (MEOH) y modificando la proporción de disolvente orgánico para separar adecuadamente a los fenoles (mezcla de 4 solutos poco polares y un soluto polar).

Para eluir los triclorofenoles (solutos poco polares) de la columna se requiere una fase móvil que contenga una alta proporción de disolvente orgánico. Al añadir metanol se actúa sobre la selectividad de la técnica de separación.

CROMATOGRAMA 2

- Fase móvil: ACN-MEOH-Fase acuosa (pH=4)

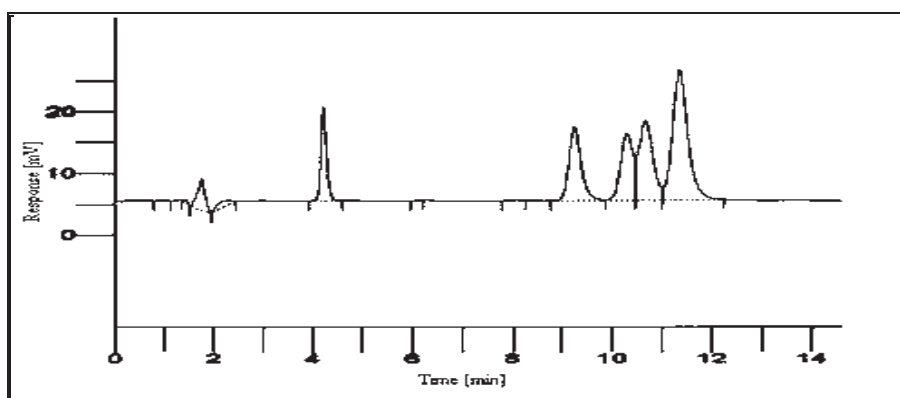


Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4) (42:12:46) v/v conteniendo HCOOH-HCOONa 0.0 1 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; $\lambda = 280$ nm, $S = 0.01$ AUFS, $\tau = 0.5$ s.

Al añadir metanol (MEOH) se modifica la selectividad de esta técnica, pero la separación no es adecuada, el tiempo de análisis es de 8.6 min, además de que dos de los compuestos quedan sin resolver en una sola banda, es decir coeluyen.

CROMATOGRAMA 3

- Fase móvil: ACN-MEOH-Fase acuosa (pH=4)



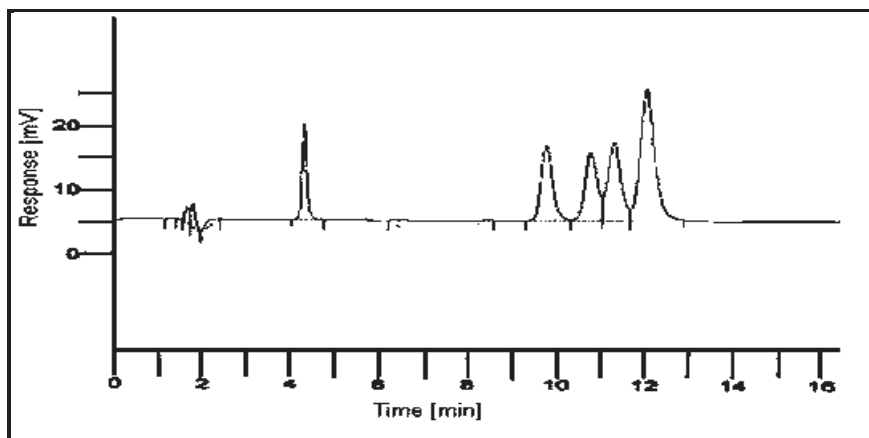
Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4) (40:8:52)) v/v conteniendo HCOOH-HCOONa 0.01M. Flujo: 1 ml/min.

Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$.

Se observa una mejor separación de los picos, pero también se observa que dos de los compuestos quedan sin resolver en una sola banda.

CROMATOGRAMA 4

- Fase móvil: ACN-MEOH-Fase acuosa (pH=4)

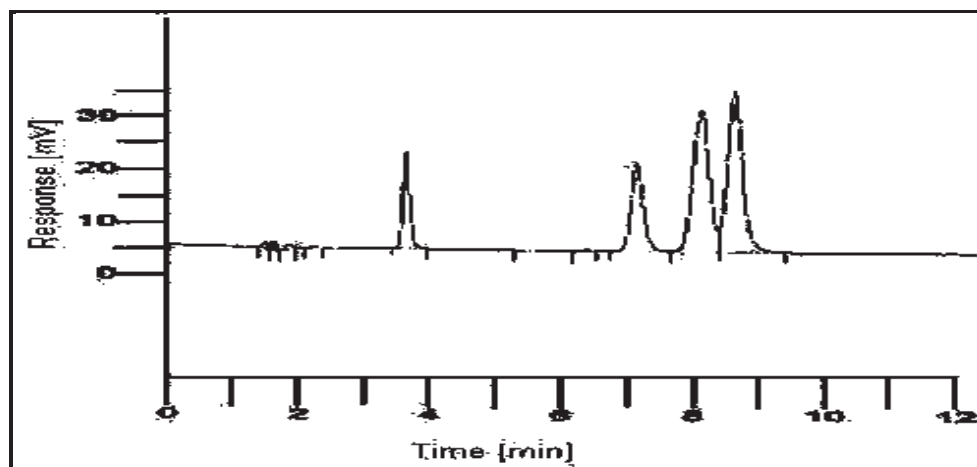


Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4) (42:10:48) v/v conteniendo HCOOH-HCOONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$.

Al disminuir la proporción de disolvente orgánico aumentan los tiempos de retención (proporción de acetonitrilo (ACN) se mantiene constante y se disminuye el metanol (MEOH)). La separación es adecuada. Se observa que dos de los picos están separados (B-V) y (V-V).

CROMATOGRAMA 5

- Fase móvil: ACN-MEOH-Fase acuosa (pH=3)



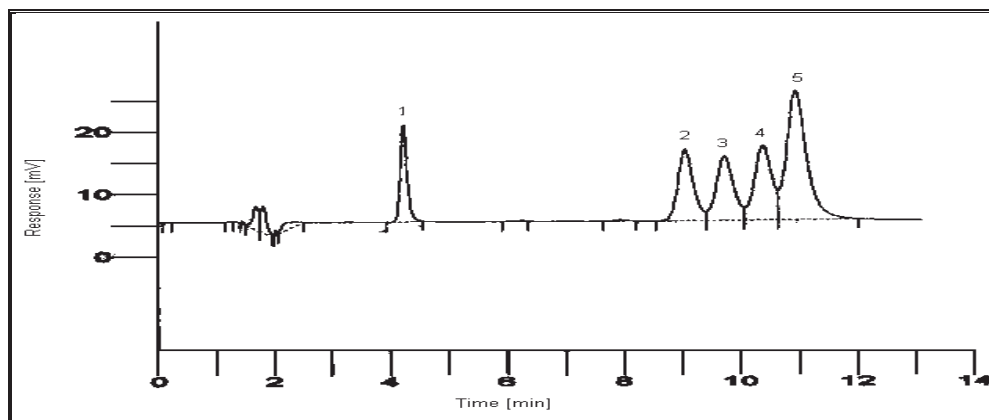
Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=3) (42:10:48) v/v conteniendo HCOOH-HCOONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

Al comparar los cromatogramas 4 y 5 se observa la selectividad proporcionada por el pH=4, el tiempo de análisis es adecuado. En este cromatograma se observa que no se separan los cinco componentes de la mezcla.

Finalmente se usó un pH=4.5 con lo que se tuvo una mejor separación del pico 3. Comparando con el cromatograma 4, se mejora ligeramente el tiempo de análisis sobre todo si se realizan análisis rutinarios y se tiene una mejor separación del pico 3.

CROMATOGRAMA 6

- Fase móvil: ACN-MEOH-Fase acuosa (pH=4.5)



Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH_3COOH - CH_3COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$.

Aquí se utilizó diferente naturaleza de buffer y diferente pH. Como se observa es una separación eficiente y cuantitativa comparada con los cromatogramas 1,2,3,4 y 5.

El orden de elución se determina inyectando la disolución de cada soluto puro por separado a las mismas condiciones que el estándar.

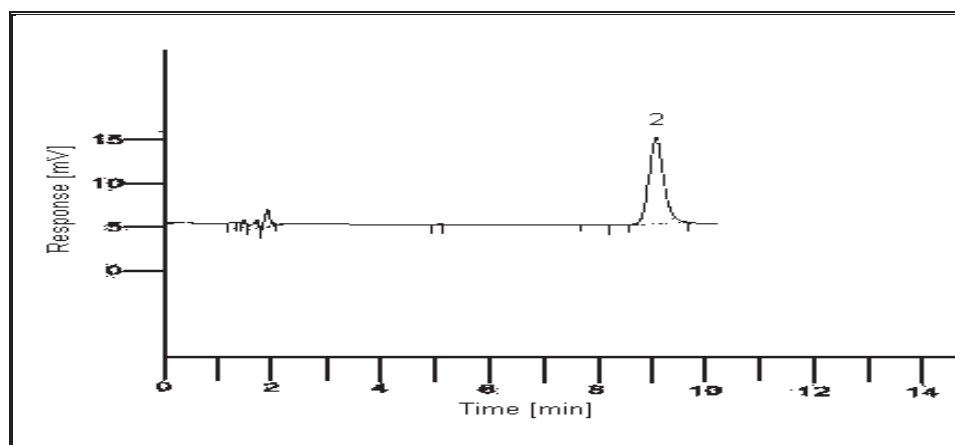
Como el estándar contiene una mezcla de 5 solutos (1 monoclorofenol y 4 triclorofenoles). El 3-Clorofenol es un soluto polar y los 4 compuestos triclorofenoles (solutos no polares). El soluto que eluye primero es el polar (3-CF).

El orden de elución fue: 1) 3-CF, 2) 2,3,4-TCF, 3) 2,4,6-TCF, 4) 2,4,5-TCF, 5) 2,3,5-TCF

La repetibilidad de la separación cromatográfica es muy importante porque la información obtenida de dicha separación es necesaria para efectuar la caracterización de los compuestos formados en la cloración del 3-Clorofenol.

A continuación se presentan los cromatogramas de cada uno de los solutos inyectados por separado. El número que tienen los picos en la parte superior en cada uno de los cromatogramas es el orden en que eluyeron.

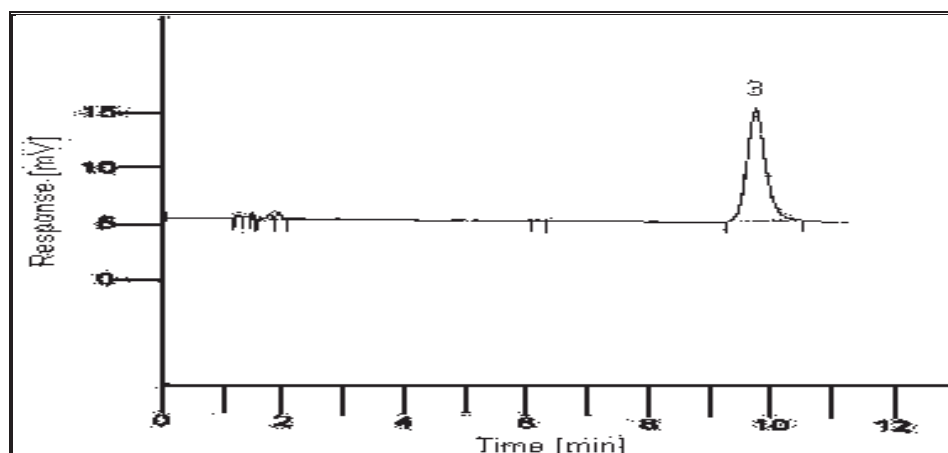
- Inyección del 2,3,4-TCF de 20 ppm.



precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo- Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min.

Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

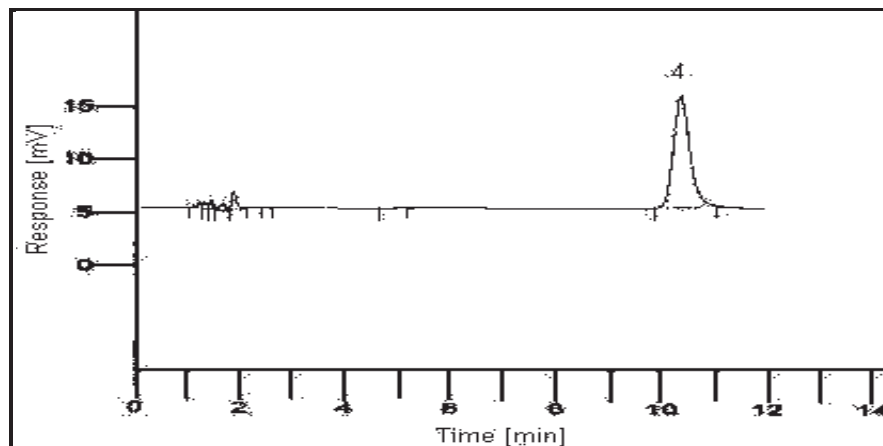
- Inyección del 2,4,6-TCF de 20 ppm.



precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo- Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min.

Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

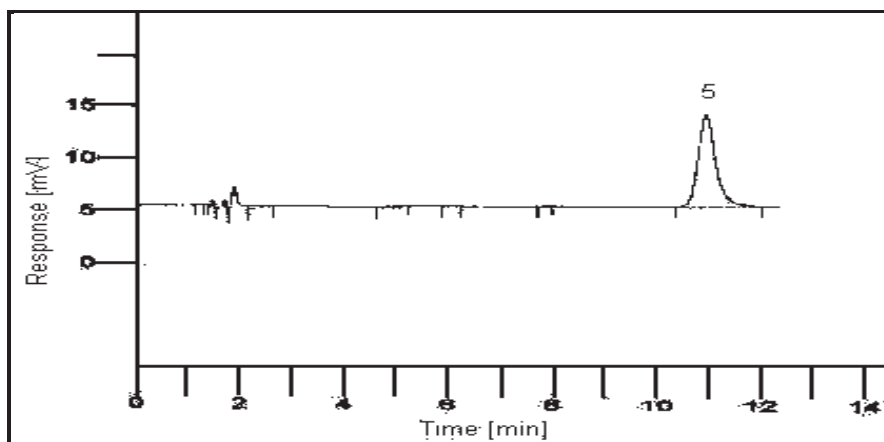
- Inyección del 2,4,5-TCF de 20 ppm.



precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo- Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min.

Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

- Inyección del 2,3,5-TCF de 20 ppm.



precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min.

Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

4.2 RESULTADOS OBTENIDOS DE LA REACCIÓN DE CLORACIÓN DEL 3-CLOROFENOL EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ESTUDIADAS.

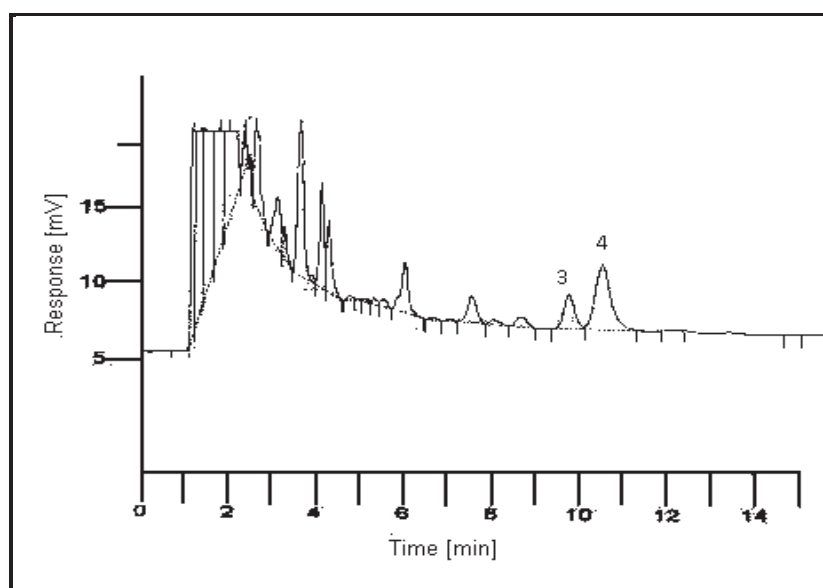
Los parámetros experimentales estudiados fueron:

- a) Concentración de cloro
- b) pH
- c) Tiempo de contacto

4.2.1 Ensayos de estudio de la reacción aforado con el buffer de fosfatos de pH=7

CROMATOGRAMA 7

- *Tiempo de contacto 10 min*



Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm disuelto en un buffer de fosfatos (pH=7), 3-CF (50 ppb), tiempo de contacto: 10min, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5) (42:8:50)v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min.

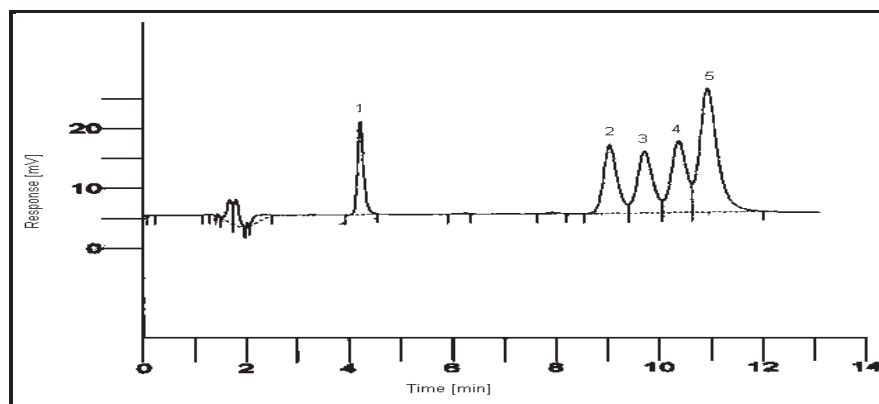
Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$.

Se observa que se forman los compuestos: 2,4,6-TCF y 2,4,5-TCF y a continuación se reportan sus respectivas concentraciones (correspondientes a las de mezcla de reacción), que fueron calculadas con la ecuación 1 del apéndice A

Compuesto	Concentración (ppb)
2,4,6-TCF	3.113
2,4,5-TCF	7.049

CROMATOGRAMA 8

- *Estándar de la mezcla de triclorofenoles.*

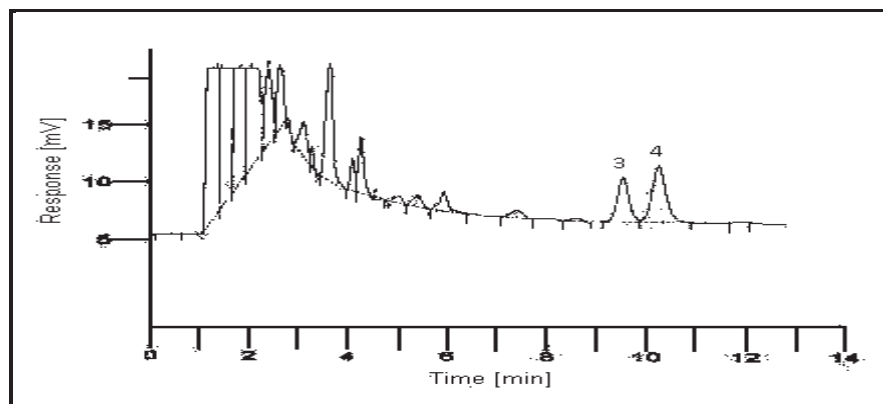


Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Tiempo de contacto 10 min.

Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$

CROMATOGRAMA 9

- *Tiempo de contacto 30 min*



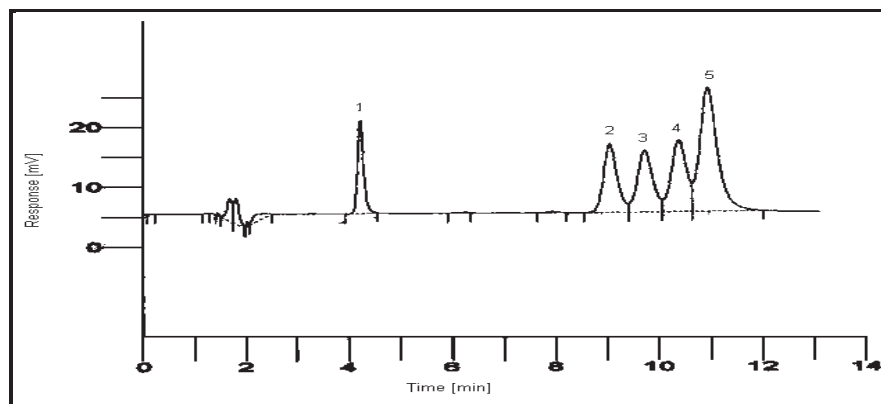
Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm disuelto en un buffer de fosfatos (pH=7), 3-CF (50 ppb), tiempo de contacto: 30min, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

Los compuestos formados fueron: 2,4,6-TCF, 2,4,5-TCF. Las concentraciones respectivas calculadas se dan a continuación.

Compuesto	Concentración (ppb)
2,4,6-TCF	4.951
2,4,5-TCF	6.659

CROMATOGRAMA 10

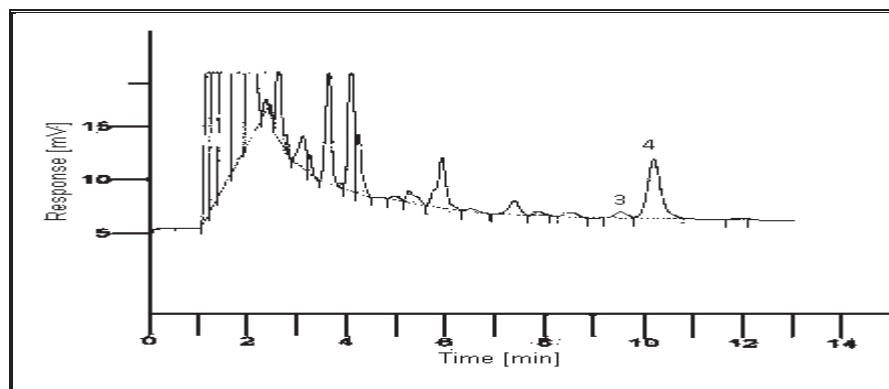
- *Estándar de la mezcla de triclorofenoles.*



Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

CROMATOGRAMA 11

- *Tiempo de contacto 1 h*



Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm disuelto en un buffer de fosfatos(pH=7), 3-CF (50 ppb), tiempo de contacto: 1h, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de

5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01M. Flujo: 1 ml/min.

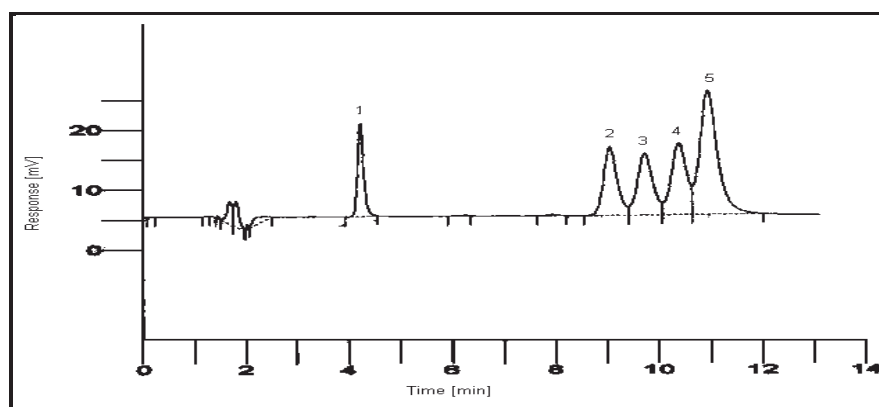
Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

Los compuestos formados fueron: 2,4,6-TCF; 2,4,5-TCF y sus concentraciones calculadas son las siguientes.

Compuesto	Concentración (ppb)
2,4,6-TCF	0.744
2,4,5-TCF	7.068

CROMATOGRAMA 12

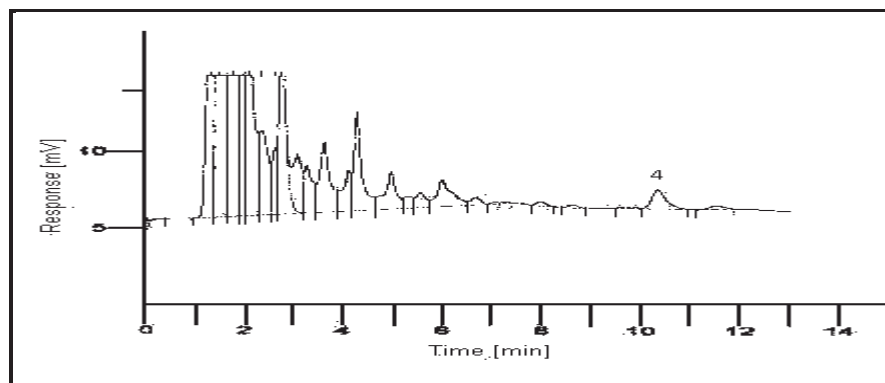
Estándar de la mezcla de triclorofenoles.



Inyección del estándar de 20 ppm de clorofenoles, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase acuosa (pH=4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

CROMATOGRAMA 13

- *Tiempo de contacto 2 h*



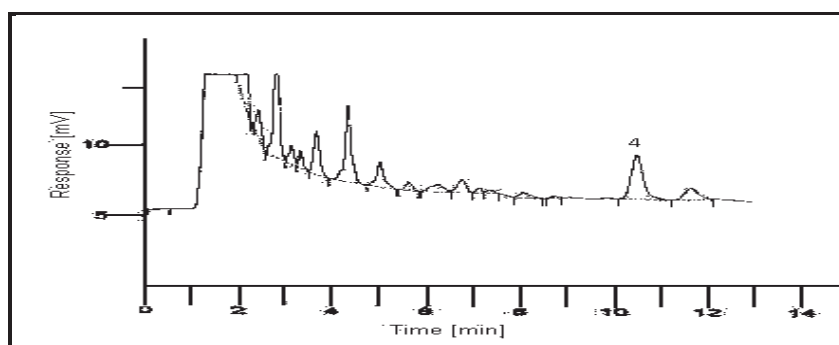
Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm disuelto en un buffer de fosfatos (pH=7), 3-CF (50 ppb), tiempo de contacto: 2h, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5)(42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

El compuesto formado es el 2,4,5-TCF y su concentración calculada es:

Compuesto	Concentración (ppb)
2,4,5-TCF	3.756

CROMATOGRAMA 14

- *Tiempo de contacto 3 h*



Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm disuelto en un buffer de fosfatos (pH=7), 3-CF (50 ppb), tiempo de contacto: 3h, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5) (42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01M. Flujo: 1 ml/min.

Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

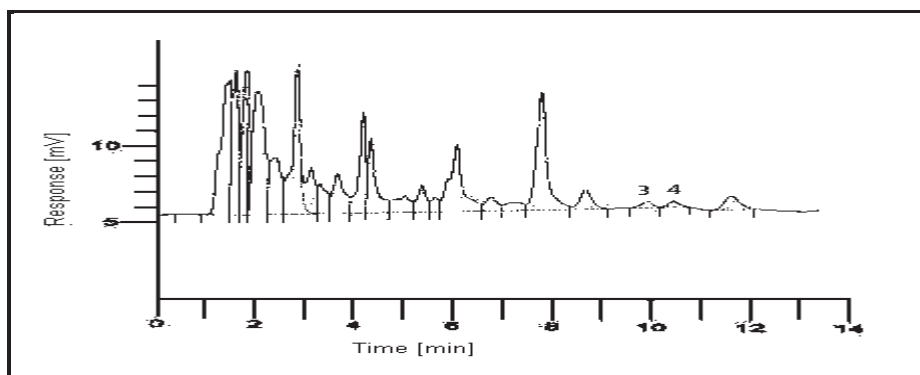
El compuesto caracterizado es el: 2,4,5-TCF y su concentración es:

Compuesto	Concentración (ppb)
2,4,5-TCF	1.632

4.2.2 Ensayos de estudio de la reacción aforado con agua nanopura (agua desionizada).

CROMATOGRAMA 15

- *Tiempo de contacto 10 min.*



Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm , 3-CF (50 ppb) en agua nanopura, tiempo de contacto: 10min, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10µm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5µm, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5)(42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M.Flujo: 1 ml/min.

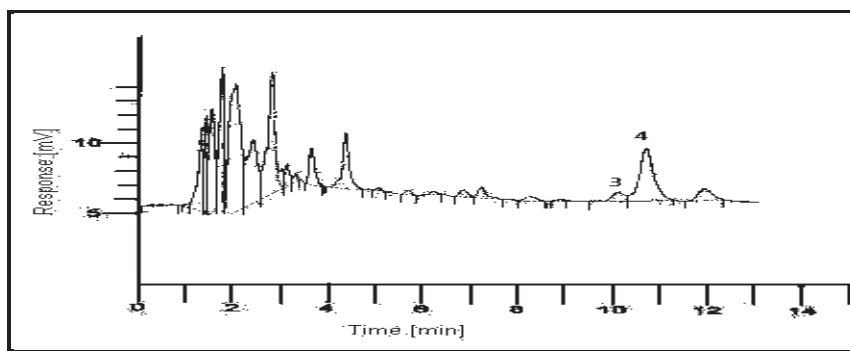
Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$.

Los compuestos caracterizados son: 2,4,6-TCF, 2,4,5-TCF y sus concentraciones calculadas son las siguientes:

Compuesto	Concentración
2,4,6-TCF	0.517
2,4,5-TCF	0.403

CROMATOGRAMA 16

- *Tiempo de contacto 30 min.*



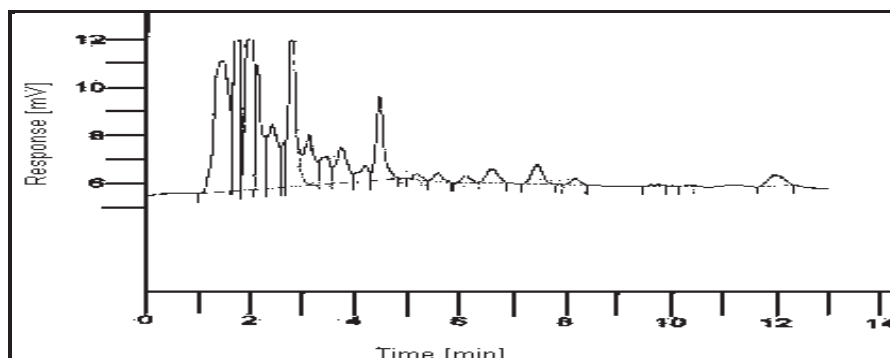
Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm, 3-CF (50 ppb) en agua nanopura, tiempo de contacto: 30min, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μm en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μm , elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5)(42:8:50) v/v conteniendo CH_3COOH - CH_3COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $S = 0.01 \text{ AUFS}$, $\tau = 0.5 \text{ s}$.

Los compuestos caracterizados son: 2,4,6-TCF, 2,4,5-TCF y sus concentraciones calculadas son las siguientes:

Compuesto	Concentración (ppb)
2,4,6-TCF	0.996
2,4,5-TCF	5.191

CROMATOGRAMA 17

- *Tiempo de contacto 1 h*

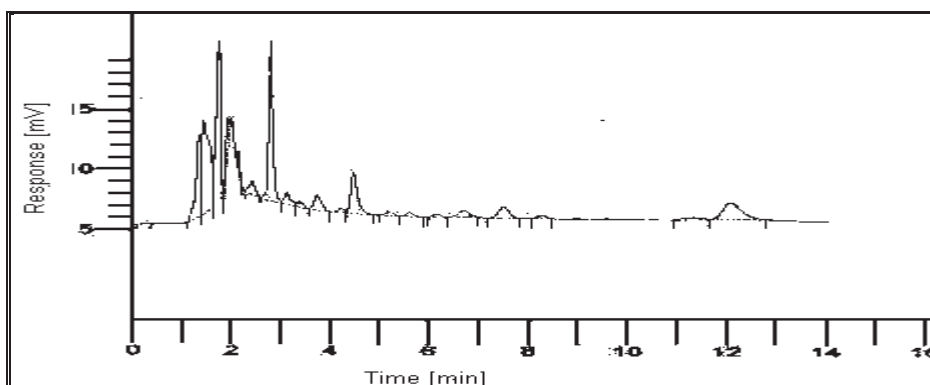


Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm , 3-CF (50 ppb) en agua nanopura, tiempo de contacto: 1h, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5)(42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M.Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

Se puede observar que ya no se forma ningún compuesto triclorado. Debido a que el anillo aromático pudo romperse y se forman compuestos alifáticos o quizás se hayan formados tetraclorofenoles o algunos otros compuestos.

CROMATOGRAMA 18

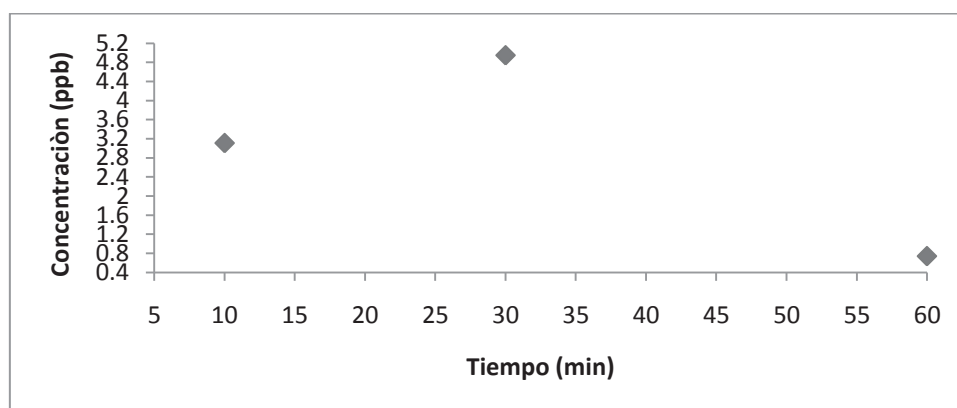
- *Tiempo de contacto 2 h*



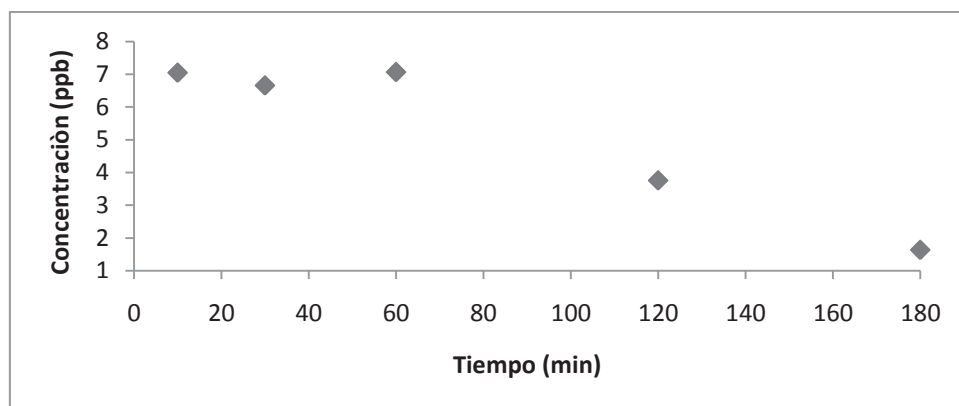
Inyección de una mezcla de cloro de 1 ppm , 3-CF (50 ppb) en agua nanopura, tiempo de contacto: 2h, precolumna polimérica (20x2 mm D.I.) de 10 μ m en línea con columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil de 5 μ m, elución isocrática, Fase móvil: Acetonitrilo-Metanol-Fase Acuosa (pH 4.5)(42:8:50) v/v conteniendo CH₃COOH-CH₃COONa 0.01 M. Flujo: 1 ml/min. Detector UV; λ = 280 nm, S = 0.01 AUFS, τ = 0.5 s.

No se forman compuestos triclorados, pero puede que se hayan formado compuestos tetraclorados u otros compuestos.

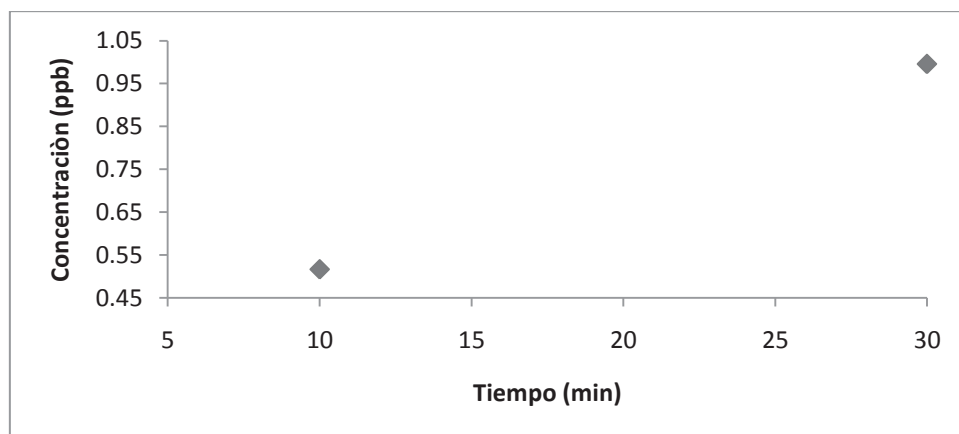
Puntos de variación de las concentraciones del producto formado 2,4,6-TCF durante la cloración del 3-clorofenol a los diferentes tiempos de contacto para una misma concentración de cloro y a pH=7.



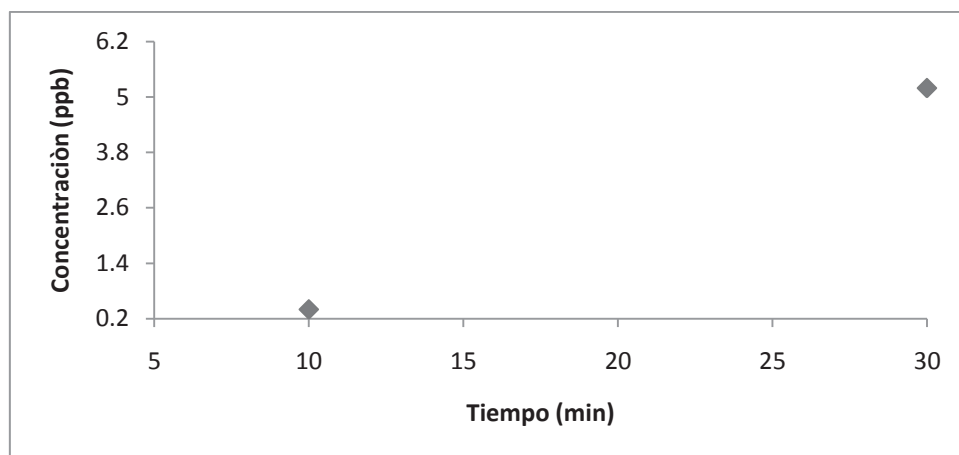
Puntos de variación de las concentraciones del producto formado 2,4,5-TCF durante la cloración del 3-clorofenol a los diferentes tiempos de contacto para una misma concentración de cloro y a pH=7



Puntos de variación de las concentraciones del producto formado 2,4,6-TCF durante la cloración del 3-clorofenol a los diferentes tiempos de contacto para una misma concentración de cloro en agua pura.



Puntos de variación de las concentraciones del producto formado 2,4,5-TCF durante la cloración del 3-clorofenol a los diferentes tiempos de contacto para una misma concentración de cloro y en agua pura.



5 CAPITULO CONCLUSIONES

- I. Se demuestra la eficiencia y selectividad de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en la separación de isómeros de posición (Triclorofenoles). La metodología analítica desarrollada está basada en un sistema en línea de EFS-CLAR (Extracción en fase sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) que permite extraer, preconcentrar, recuperar y analizar los triclorofenoles formados durante la cloración del 3-Clorofenol.
- II. La cloración del 3-CF conlleva a la formación de 2 compuestos triclorados 2,4,5-TCF y 2,4,6-TCF predominando el primero sobre el segundo y las concentraciones de los compuestos 2,4,5-TCF y 2,4,6-TCF obtenidas son menores comparadas con las máximas establecidas por la USEPA.
- III. Se concluye que el 3-CF es menos reactivo en el agua pura que en medio amortiguado de pH=7. Debido a que a mayores tiempos de contacto de la reacción ya no se forma ningún compuesto triclorado.

6 CAPITULO BIBLIOGRAFÍA

- 1) J. Pawliszyn, Applications of solid Microextraction, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- 2) Snoeyink L. Vernon & Jenkins David, Química del Agua, Limusa, México, (1999).
- 3) G. F. Lee, "Kinetics of Reactions Between Chlorine and Phenolic Compounds". John Wiley, New York, 1980.
- 4) V. Picon and M.C. Hennion, J. Chromatography A, 665 (1994) 269. Marie Claire Hennion, Journal of Chromatography A, 856 (1999) 3-54. S.D. Richardson.
- 5) Drinking Water Disinfection By-products, in: R.A Meyers (Ed.), The Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation. Vol. 3, Wiley, New York, USA, 1998, PP. 1398.
- 6) N.H. Snow, J. Chromatographia. A, 885 (2000)
- 7) H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatographia. A, 902 (2000)
- 8) B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, Crit. Rev. Anal. Chem. 31 (2001)
- 9) H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, Trends Anal. Chem. 18 (1999)
- 10) D. Puig and D. Barceló, Chromatographia, 40 (1995) 435.
- 11) L. Snoeyink Vernon, Jenkins David, Química del Agua, Ed. Limusa, (1997)
- 12) Ingeniería Sanitaria, Francisco Unda Opazo
- 13) Química Orgánica, TW Graham Solomons
- 14) Enciclopedia de la Tecnología Química, Kirk Othmer
- 15) Lee G.F. and Morris J.C., Int. Air Water Pollut., 6 (1962) 19
- 16) Química Orgánica, John McMurry 7ª edición
- 17) Química Orgánica Básica y Aplicada de la molécula a la industria, Eduardo Primo Yúfera
- 18) MORRISON, R.T. BOYD, R.N. Química Orgánica, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. México (1990).
- 19) Atlanta, GA; Departamento de Salud y servicios humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.
- 20) www.ces.iisc.ernet.in/energy/Hc270799/.../vol314j.htm

-
- 21) Ingeniería Ambiental, J. Glynn Henry, Gary W. Heinke
 - 22) Principios de Análisis Instrumental, Skoog Holler Nieman
 - 23) www.ingenieroambiental.com/leyes/decreto831.htm
 - 24) MOHLER, E.F.; JACOB, L.N. Anal. Chem. 29 (1957)
 - 25) AFGHAN, B.K; BELLIVEAU, P.E; LAROSE, R.H.; RYAN, J.E. Anal. Chem. Acta 71 (1974)
 - 26) Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. Universidad Autónoma Metropolitana. M.C. María Guadalupe Prado Flores, M.C. María del Rosario Cobarrubias Herrera. Primera edición (1996).
 - 27) Química Analítica, 6ª edición (1997). Skoog, West, Holler Mc. Graw-Hill.
 - 28) ANGELINO; GENNARO, M.C. Anal. Chem. Acta, 346 (1997)
 - 29) ELVIRA COZAR; CANO FAUNA P; PÉREZ ARRIBAS; LEÓN GONZÁLEZ; POLO DIEZ, L.M. Chromatographia (1995).
 - 30) MARTÍNEZ O; POOURULL E; MARCE, R.M BORRULL E. Chromatographia (1996).
 - 31) MODER M; SCHHRADERS, 5; FRANCK U; POPP P. Anal. Chem, 357 (1997).
 - 32) Cromatografía Líquida de alta resolución, Adrian Garcia de Marina, Benito del castillo
 - 33) L. Shoeyink Vernon, Jenkins David, Química del Agua, Ed. Limusa, (1997)
 - 34) CAMEL, V.; CAUDE, M. J, Chromatogr. A, 710, 3-19 (1995).
 - 35) POOLE, S. It; JEAN, 1. A.; OUDSEMA, J. M.; POOLE, O. E. Anal. Chim. Acta, 236, 3-12 (1990).
 - 36) An Encyclopedia of Chemicals drugs and Biologicals, The Merck Index.
 - 37) Química Medio Ambiental, Thomas G. Spiro, William M. Stigliani.
 - 38) www.epa.gov/safewater/mcl/html.
 - 39) books.google.com.mx/books?isbn=968186042x.

7 APENDICE A

ECUACION UTILIZADA EN EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACION DE PRODUCTO FORMADO.

$$Cd = \frac{A_m * C_{std} * V_{iny}}{A_{std} * V_m * b} \quad \text{ECUACIÓN 1}$$

Donde:

- Cd = Concentración determinada para el compuesto fenólico.
 Am = Área del pico del analito en el cromatograma de la muestra.
 Ast = Área del pico del analito en el cromatograma del estándar.
 b = Factor correctivo que toma en cuenta la recuperación promedio del compuesto; este factor corresponde a la pendiente de las rectas de "Cantidad Recuperada Vs Cantidad Analizada".
 Cst = Concentración del analito en el estándar inyectado.
 Viny = Volumen inyectado del estándar (volumen rizo del inyector).
 Vm = Volumen de la muestra fortificada que fue cargado en el precolumna de EFS.

Unidades de los parámetros:

- Cd = [ppb]
 Am = [μ V].
 Ast = [μ V].
 Cst = 20 ppm = 20000 ppb (μ g/L).
 Viny = 20 μ L = 2×10^{-5} L.
 Vm = 25 ml = 0.025 L.
 b = Este valor depende del compuesto para el cual se este determinando su concentración y representa el % de recuperación o de recobro de cada analito.

Analito	Valor de la Pendiente (b)
3-CLOROFENOL	0.92
2,3,4-TRICLOROFENOL	0.96
2,4,6-TRICLOROFENOL	0.94
2,4,5-TRICLOROFENOL	0.93
2,3,5-TRICLOROFENOL	0.96