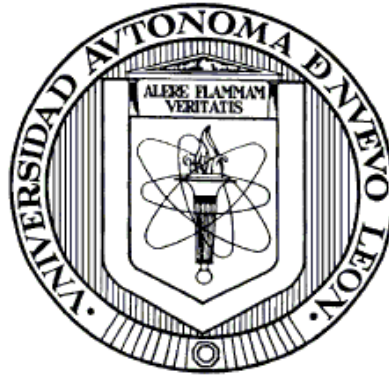


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
LA SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE 11 COMPUESTOS FENÓLICOS
EN MUESTRAS DE AGUA

Por

MANUEL ALEJANDRO ALEMÁN GARCÍA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Química Analítica Ambiental

Junio, 2008

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
LA SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE 11 COMPUESTOS FENÓLICOS
EN MUESTRAS DE AGUA

Aprobación de la tesis:

DRA. NORA EMMA DÍAZ MOROLES
Directora de Tesis

Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Manuel Alejandro Alemán García

Fecha de Graduación: Junio, 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE 11 COMPUESTOS FENÓLICOS
EN MUESTRAS DE AGUA

Número de páginas: 71

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con orientación en Química Analítica
Ambiental.

Área de Estudio: Química Analítica Ambiental

Propósito y Método del Estudio: Debido a que el agua es un elemento imprescindible para las actividades humanas, es importante verificar su calidad. Un grupo de contaminantes orgánicos lo constituyen los compuestos fenólicos, los cuales se encuentran en la lista de contaminantes prioritarios debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas. La importancia de este trabajo se centra en que no existe reportada la validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta para determinar a los 11 compuestos fenólicos contaminantes prioritarios. En este trabajo se desarrolló y validó metodología analítica para la determinación de compuestos fenólicos en muestras de agua. Se desarrolló el método de separación y cuantificación de los 11 analitos y se evaluó el desempeño de dos técnicas de extracción. Se seleccionó la técnica de extracción en fase sólida para el tratamiento de la muestra.

Contribuciones y Conclusiones: La metodología desarrollada es aplicable a la determinación de compuestos fenólicos en muestras de agua y permite determinar compuestos fenólicos en niveles de concentraciones inferiores a los estipulados en regulaciones internacionales (OMS, EPA) y nacionales, lo cual es trascendental ya que nuestro país no cuenta con metodología para la determinación individual de estos compuestos fenólicos contaminantes prioritarios.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme seguir aprendiendo.

A la Dra. Nora Díaz, por su asesoría, apoyo y buenos consejos en todo momento.

A la Dra. Idalia Gómez por permitirme trabajar en el laboratorio de Vía Húmeda y Sol-Gel.

A los miembros del comité que revisó esta tesis: Dr. Juan Manuel Alfaro, MC Isabel Sáenz y MC Perla Elizondo por sus valiosas aportaciones y sugerencias.

A todos mis maestros desde Licenciatura hasta Posgrado, a quienes les debo mi formación como Químico Industrial.

A la Facultad de Ciencias Químicas UANL, por permitirme llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A todas aquellas personas que no mencioné que dejaron algo positivo en mí durante mi estancia en el posgrado. Gracias.

A la Dra. Aracely Hernández por proveer el equipo y reactivos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A todas aquellas personas que no mencioné, que de alguna manera me hicieron daño durante mi estancia en posgrado, porque por personas como ustedes he obtenido importantes experiencias y sigo y seguiré esforzándome para mejorar en todos los aspectos de mi vida. Por que si me hacen caer, me volveré a levantar. Gracias y que Dios los bendiga.

DEDICATORIA

A mi mamá,
María Guadalupe García Lara,
por su amor y confianza,
porque lloró cuando yo lloré.

A Alejandrina Medina,
por su amor y comprensión,
una de las personas más importantes de mi vida,
mi mejor amiga,
quien ha estado conmigo cuando
los demás me han dado la espalda.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Naturaleza Química de los Compuestos Fenólicos	1
1.1.1. Importancia de los Compuestos Fenólicos.....	1
1.1.2. Generalidades Sobre Compuestos Fenólicos	2
1.1.3. Estructura Química	4
1.1.4. Origen y Propiedades	5
1.1.5. Toxicidad.....	7
1.1.6. Límites Máximos Permisibles.....	8
1.2 Aplicaciones de los Compuestos Fenólicos	9
1.3 Métodos para la Determinación de Compuestos Fenólicos	10
1.3.1. Métodos Espectrofotométricos en Ultravioleta Visible	11
1.3.2. Métodos Cromatográficos	12
1.3.2.1 Cromatografía de Gases	12
1.3.2.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	13
1.4 Antecedentes	14
1.5 Preparación de Muestras	19
1.6 Justificación	20
1.6.1 Hipótesis	21
1.6.2 Objetivo General	21
1.6.3 Objetivos Específicos	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 Equipos, Material y Reactivos.....	23
2.1.1 Equipo.....	23
2.1.2 Material	23
2.1.3 Reactivos	24
2.2 Metodología	25
2.2.1 Preparación de Soluciones	25
2.2.2 Condiciones Cromatográficas	27

2.3	Validación del Sistema Cromatográfico	27
2.3.1	Linealidad.....	27
2.3.2	Precisión	29
2.3.3	Exactitud	30
2.3.4	Límite de Detección	31
2.3.5	Límite de Cuantificación.....	31
2.3.6	Intervalo de Trabajo	32
2.4	Selección del Método de Extracción	32
2.4.1	Metodología General para la Extracción en Fase Sólida ...	32
2.4.2	Metodología General para la Extracción Líquido-Líquido ..	33
2.5	Validación del Método: Extracción-HPLC-UV	34
3.	RESULTADOS.....	35
3.1	Condiciones de Separación	35
3.2	Validación del Sistema Cromatográfico	38
3.3	Selección del Método de Extracción	45
3.3.1	Extracción Líquido-Líquido.....	45
3.3.2	Extracción en Fase Sólida.....	47
3.4	Validación del Método de Análisis por SPE-HPLC-UV	49
4.	DISCUSIÓN	58
4.1	Separación.....	58
4.2	Validación del Sistema Cromatográfico	60
4.3	Evaluación de los Métodos de Extracción.....	62
4.3.1	Extracción en Fase Sólida	62
4.3.2	Extracción Líquido-Líquido.....	62
4.3.3	Selección del Método de Extracción	63
4.3.4	Exactitud	63
4.4	Validación del Método SPE-HPLC-UV.....	63
5.	CONCLUSIONES	65

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Propiedades Físicas y Constantes de Acidez de los Compuestos Fenólicos.....	6
2. Concentraciones en ppm de los Diferentes Analitos a los 8 Niveles	26
3. Concentraciones en ppm de los Analitos en las muestras de agua preparadas para la validación del sistema cromatográfico	30
4. Condiciones Finales para la Separación de los Compuestos Fenólicos.....	35
5. Tiempos de Retención de los Compuestos Fenólicos en las Condiciones Cromatográficas Establecidas.....	37
6. Resultados Obtenidos de la Validación del Sistema Cromatográfico ...	39
7. Porcentajes de Recuperación de Compuestos Fenólicos usando LLE.	46
8. Exactitud (%R) y Precisión (%RSD) para SPE en Cartuchos de Muestras Preparadas en Laboratorio con los Once Compuestos Fenólicos en Concentraciones de 1-5 ppm.....	48
9. Resultados Obtenidos de la Validación del Método Cromatográfico	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura y Abreviatura de los Fenoles Contaminantes Prioritarios	4
2. Cromatograma de 11 Compuestos Fenólicos Obtenido por HPLC-UV en las Condiciones de Operación Finales.....	36
3. Curva de Calibración para Fenol (Validación del Sistema Cromatográfico)	39
4. Curva de Calibración para 4-NF (Validación del Sistema Cromatográfico)	40
5. Curva de Calibración para 2-NF (Validación del Sistema Cromatográfico)	40
6. Curva de Calibración para 2-CF (Validación del Sistema Cromatográfico)	41
7. Curva de Calibración para 2-M-4,6-DNF (Validación del Sistema Cromatográfico)	41
8. Curva de Calibración para 2,4-DMF (Validación del Sistema Cromatográfico)	42
9. Curva de Calibración para 4-C-3-MF (Validación del Sistema Cromatográfico).....	42
10. Curva de Calibración para 2,4-DCF (Validación del Sistema Cromatográfico)	43
11. Curva de Calibración para 2,4-DNF (Validación del Sistema Cromatográfico)	43
12. Curva de Calibración para TCF (Validación del Sistema Cromatográfico)	44
13. Curva de Calibración para PCF (Validación del Sistema Cromatográfico)	44
14. Curva de Calibración para Fenol (Validación del Método Cromatográfico)	50

Figura	Página
15. Curva de Calibración para 4-NF (Validación del Método Cromatográfico)	50
16. Curva de Calibración para 2-NF (Validación del Método Cromatográfico)	51
17. Curva de Calibración para 2-CF (Validación del Método Cromatográfico)	51
18. Curva de Calibración para 2-M-4,6-DNF (Validación del Método Cromatográfico)	52
19. Curva de Calibración para 2,4-DMF (Validación del Método Cromatográfico)	52
20. Curva de Calibración para 4-C-3-MF (Validación del Método Cromatográfico)	53
21. Curva de Calibración para 2,4-DCF (Validación del Método Cromatográfico)	53
22. Curva de Calibración para 2,4-DNF (Validación del Método Cromatográfico)	54
23. Curva de Calibración para TCF (Validación del Método Cromatográfico)	54
24. Curva de Calibración para PCF (Validación del Método Cromatográfico)	55
25. Cromatograma de un Blanco (Metanol) en las Condiciones de Operación Finales	55
26. Cromatograma de Agua de Grifo sin Adicionar Analitos	56
27. Cromatograma de Agua de Grifo Adicionada con Estándares de los 11 Compuestos Fenólicos	57

NOMENCLATURA

USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
2,4-DMF	2,4-dimetilfenol
4-NF	4-nitrofenol
4-C-3-MF	4-cloro-3-metilfenol
2,4-DNF	2,4-dinitrofenol
2-NF	2-nitrofenol
F	Fenol
2-M-4,6-DNF	2-metil-4,6-dinitrofenol
2,4-DCF	2,4-diclorofenol
2-CF	2-clorofenol
TCF	2,4,6-triclorofenol
PCF	Pentaclorofenol
CE	Comunidad Europea
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
GC	Cromatografía de Gases
UV-VIS	Ultravioleta Visible

pH	Potencial de hidrógeno
µg/mL	Microgramos por mililitro
µg/L	Microgramos por litro
LLE	Extracción líquido-líquido
GC-ECD	Cromatografía de Gases con Detector de Captura de Electrones
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
HPLC-UV	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector Ultravioleta-Visible
C 18	Octadecilsilano
C 8	Octilsilano
F.R.	Factor de Respuesta
RSD	Desviación Estándar Relativa
SD	Desviación Estándar
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
y _B	Señal del blanco
S _B	Desviación estándar del blanco
HOAc	Ácido acético
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
% R	Porcentaje de Recuperación
SPE	Extracción en Fase Sólida
ND	No Detectable

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Naturaleza química de los compuestos fenólicos

1.1.1 Importancia de los compuestos fenólicos

Los fenoles y sus derivados constituyen un centro relevante de atención en el estudio de contaminación y medio ambiente, debido a su toxicidad y persistencia. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA)¹ considera once compuestos fenólicos como contaminantes prioritarios: 2,4-dimetilfenol (2,4-DMF), 4-nitrofenol (4-NF), 4-cloro-3-metilfenol (4-C-3MF), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF), 2-nitrofenol (2-NF), fenol (F), 2-metil-4,6-dinitrofenol (2-M-4,6-DNF), 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), 2-clorofenol (2-CF), 2,4,6-triclorofenol (TCF) y pentaclorofenol (PCF).

La presencia de estos compuestos en el medio ambiente es consecuencia, en gran parte, de procesos industriales y agrícolas². Por otro lado, la importancia que tienen estos fenoles para la salud humana³, así como su posible presencia en agua⁴, suelos⁵ y alimentos⁶, hace que las cantidades máximas de fenoles estén reguladas por la legislación de cada país y organismos internacionales.

La Comunidad Europea (CE) establece como concentración máxima admisible de fenoles en agua de consumo, 0.1 ppm en contenido individual y 0.5 ppm en contenido total⁷.

Los clorofenoles se consideran tóxicos a concentraciones por debajo de ppm. Otra característica importante de estos compuestos es su persistencia en el medio ambiente. El pentaclorofenol, además, produce alteraciones en los cromosomas, acción que está relacionada con la oncogenia. Los nitrofenoles pueden producir alteraciones del metabolismo, produciendo un agotamiento completo de las proteínas. La intoxicación con pentaclorofenol produce problemas en el riñón y en el hígado³.

1.1.2 Generalidades sobre compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos aromáticos que contienen grupos hidroxilo ligados directamente al anillo aromático^{8,9}.

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 antisépticos¹⁰.

Por otra parte, los fenoles como los alcoholes, contienen el grupo -OH , teniendo estas familias algunas características semejantes.

Los fenoles contaminantes prioritarios tienen características ácido-base, sin embargo, su comportamiento depende del tipo y número de sustituyentes. Los sustituyentes que atraen electrones, como halógenos y grupos nitro, aumentan la acidez, mientras que los sustituyentes que los liberan como los grupos metilo, la disminuyen.

Los fenoles son 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 compuesto fenólico de una mezcla de compuestos por medio de una extracción con solvente acuoso básico y posterior reacidificación.

Como regla general, los fenoles con sustituyentes electrofílicos son más ácidos, puesto que estabilizan el ion fenóxido al deslocalizar la carga negativa¹⁰.

1.1.3 Estructura química

La estructura y abreviaturas de los 11 fenoles contaminantes prioritarios se presentan a continuación:

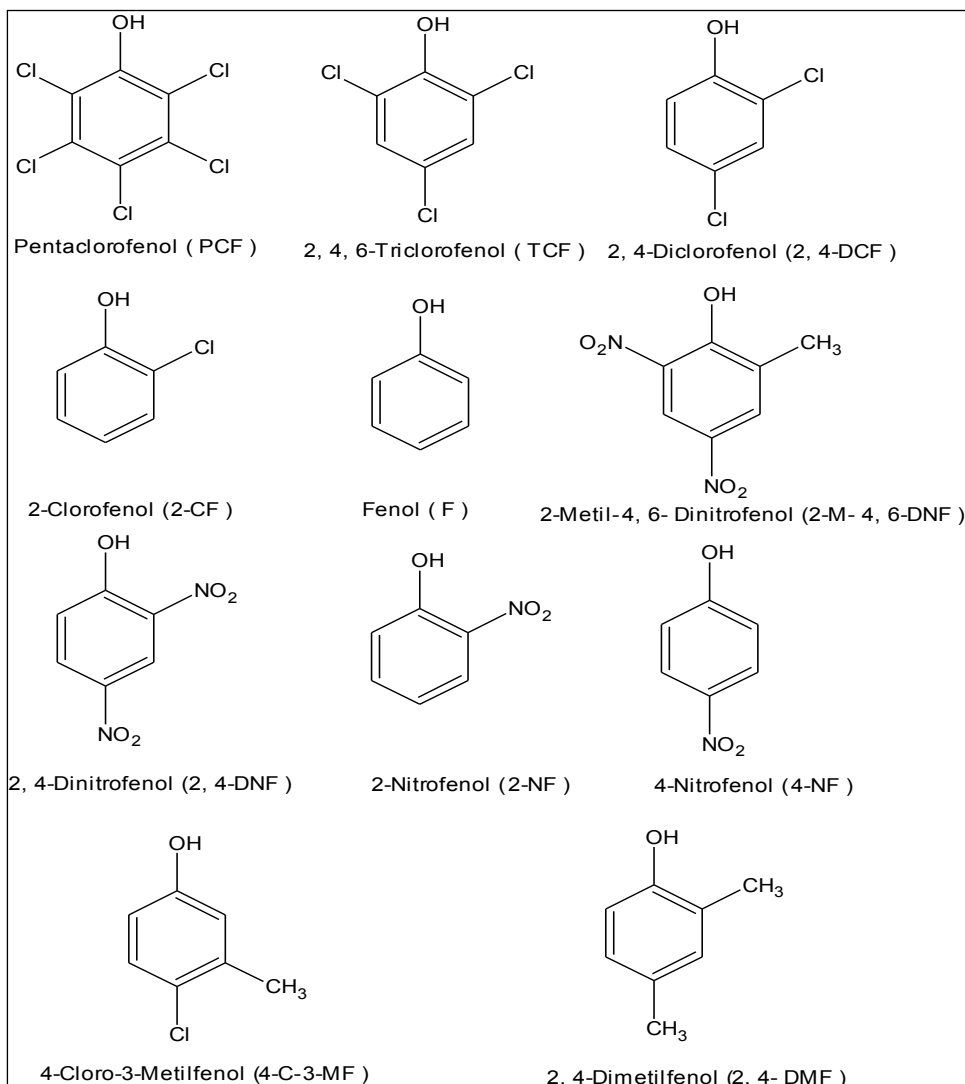


Figura 1. Estructura y abreviatura de los fenoles contaminantes prioritarios

1.1.4 Origen y propiedades

Los compuestos fenólicos pueden estar presentes en aguas residuales domésticas e industriales, en las aguas naturales y en los suministros de agua potable. Si el agua que contiene fenoles se clora, aumenta su potencial tóxico, ya que se forman los clorofenoles. Una cantidad importante de clorofenoles se obtiene a partir de los procesos de cloración y se producen en la purificación de las aguas residuales y blanqueamiento de papel.

El cloro también se utiliza para evitar el crecimiento de algas y otros organismos en procesos de refrigeración de las centrales hidroeléctricas y aunque los fenoles se encuentran en bajas concentraciones, tienen gran importancia debido al gran volumen de agua tratada, lo que conlleva la liberación de grandes cantidades de clorofenoles al medio ambiente.

Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición bastante elevados debido a la formación de puentes de hidrógeno intermolecular.

Los fenoles generalmente son incoloros, sin embargo, el grupo nitro es capaz de darles coloración. Los fenoles se oxidan con facilidad, por lo tanto podemos encontrarlos coloreados, así que su purificación es muy importante.

La oxidación de los fenoles depende de la exposición a la luz y al aire, como también de la presencia de impurezas metálicas. La oxidación es un proceso complejo, en el que influye en gran parte su propia estructura y la mayoría de ellos dan lugar a derivados de difenilo o a quinonas, que son los responsables de la coloración de estos compuestos¹⁰.

TABLA 1.
PROPIEDADES FÍSICAS Y CONSTANTES DE ACIDEZ DE COMPUESTOS
FENÓLICOS¹¹

Compuesto	Peso molecular	pKa	Punto de fusión °C	Punto de ebullición °C	Densidad relativa
PCF	266.34	5.25	191.0	310.0	1.978 (22°C)
TCF	197.45	6.00	69.5	246.0	1.490 (35°C)
2,4-DCF	163.00	7.95	45.0	210.0	-
2-CF	128.56	8.48	9.0	174.9	1.263 (20°C)
F	94.11	9.99	43.0	181.7	1.072 (20°C)
2-M-4,6-DNF	198.13	4.31	83.0 – 85.0	-	-
2,4-DNF	184.11	3.94	115.0 – 116.0	8.0	1.683 (24°C)
2-NF	139.11	7.23	45.3 – 45.7	216.0	1.294 (40°C)
4-NF	139.11	7.08	114.9 – 115.6	279.0 (Sublima)	1.479 (20°C)
4-C-3-MF	142.59	9.55	66.0 – 68.0	235.0	-
2,4-DMF	122.17	10.58	27.0 – 28.0	210.0	1.542 (14°C)

1.1.5 Toxicidad

La toxicidad del fenol y sus derivados es conocida desde hace muchos años, debido a su acción como desinfectante. De acuerdo a la Agencia de Sustancias Tóxicas de USA³ los vapores líquidos del fenol son tóxicos y pueden ingresar fácilmente al cuerpo por vía cutánea. Los vapores inhalados lesionan las vías respiratorias. El contacto del líquido con la piel y los ojos produce severas quemaduras. La exposición prolongada paraliza el sistema nervioso central y produce lesiones renales y pulmonares.

Los alquilfenoles y los nitrofenoles se pueden absorber por inhalación, por ingestión y a través de la piel. Estos compuestos son corrosivos para la piel, los ojos y el tracto respiratorio, además son corrosivos por ingestión. Estas sustancias son tóxicas para los organismos acuáticos. En la cadena alimenticia para los seres humanos tiene lugar bioacumulación en peces.

Los clorofenoles pueden ser absorbidos por los pulmones, por el tracto intestinal y por la piel. Estos compuestos irritan los ojos y las vías respiratorias. Las dosis letales de los clorofenoles en humanos, que van desde 50 a 500 mg/kg por vía oral, producen convulsiones, coma y finalmente la muerte.

Entre los efectos de los compuestos fenólicos sobre los seres vivos hay que destacar la modificación que produce en los cromosomas⁵.

1.1.6 Límites máximos permisibles

En el caso del fenol, la EPA ha determinado que el nivel del fenol en aguas naturales (ríos, arroyos) se debe limitar a 3.5 ppm, con el objeto de proteger la salud de los seres humanos de los efectos potencialmente tóxicos de la exposición al fenol a través de la ingestión de agua y organismos acuáticos contaminados. También recomienda que el agua no contenga más de 0.04 ppm de 2-clorofenol y no más de 0.03 ppm de 2,4-diclorofenol¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS)¹² tiene como criterio que la concentración del 2,4,6-triclorofenol en agua potable no debe rebasar 0.2 ppm y la concentración de pentaclorofenol la limita a 0.009 ppm.

Como se había mencionado anteriormente, la Comunidad Europea establece como concentración máxima permitida de fenoles en agua de consumo, 0.1 ppm en contenido individual y 0.5 ppm en contenido total.

En México, la NOM-127-SSA1-1994, y su modificación del año 2000 establecen los límites máximos permisibles de fenoles o compuestos fenólicos en agua para uso y consumo humano. Dicha norma establece como límite máximo permisible de fenoles totales, 0.3 ppm en agua^{13, 14}.

1.2 Aplicaciones de los compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos de gran interés industrial debido a la diversidad de aplicaciones y por eso aumenta el riesgo de que estos compuestos se dispersen en el medio ambiente.

El fenol y sus derivados se usan¹⁵ principalmente como:

- Conservadores de la madera: se utiliza el pentaclorofenol por su acción fungicida; así como el 4-cloro-3-metilfenol.
- Plásticos, resinas y plastificantes: el fenol y sus derivados sencillos se usan en la fabricación de resinas fenol-formaldehído para revestimientos y como agentes de unión de productos laminados. Los metilfenoles se usan para la fabricación del fosfato tricisélico, que es un plastificante útil para el acetato de celulosa, la nitrocelulosa, la etilcelulosa y los plásticos de vinilo.
- Colorantes: Por formación de complejos en la reacción entre un compuesto fenólico y otro compuesto aromático.

- Detergentes: Se usan los compuestos fenólicos en la fabricación de detergentes porque ellos mismos tienen actividad superficial.
- Desinfectantes: La acción desinfectante de un compuesto fenólico es debido a su acción superficial y coagulante. El 2-clorofenol ha sido utilizado para evitar el desarrollo de hongos.
- Medicamentos, perfumes y sabores: la fenolftaleína es un derivado del fenol. El ácido acetilsalicílico deriva del fenol por la síntesis de Kolbe para la fabricación de la aspirina.
- Explosivos: algunos fenoles tienen propiedades detonantes, como el 2,4,6-trinitrofenol.
- Reactivos en síntesis orgánica: El 2,4-diclorofenol se utiliza en la producción del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).
- El 2-nitrofenol se usa en la preparación del 2-aminofenol y del 2-nitroanisol en ciertos tintes.

1.3 Métodos para la determinación de compuestos fenólicos

Con relación a los métodos analíticos más relevantes para la determinación de fenoles, se destacan la espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC)¹⁰.

1.3.1 Métodos espectrofotométricos en ultravioleta-visible (UV-VIS)

Para la determinación de fenoles al nivel de $\mu\text{g/L}$ por espectrofotometría ultravioleta-visible de forma directa es difícil debido a la baja absorptividad molar de estos compuestos.

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 distintos tipos de fenoles.

Las reacciones más comunes son las de copulación que generan colorantes azoicos intensamente coloreados y que son fácilmente analizables en el espectro visible¹⁰. 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 y posición de los sustituyentes en el anillo aromático.

El método de la 4-aminoantipirina es el más rápido, preciso y exacto de los métodos espectrofotométricos existentes para determinar fenoles en aguas residuales. El método anterior se encuentra dentro de la normatividad mexicana. De acuerdo a la norma NMX-AA-050-SCFI-2001, este método se utiliza para la determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas¹⁶.

1.3.2 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. Dentro de los métodos cromatográficos se utilizan con más frecuencia la cromatografía de líquidos de alta resolución y la cromatografía de gases.

1.3.2.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica bastante utilizada para el análisis de compuestos fenólicos, debido a la eficacia en la separación, rapidez del análisis y sensibilidad.

El método 604 de la EPA se utiliza para la determinación de los 11 compuestos fenólicos contaminantes prioritarios en aguas de desecho industrial y municipal. Este método emplea extracción líquido-líquido (LLE) y cromatografía de gases con detección de captura de electrones (GC-ECD)¹.

La cromatografía de gases presenta desventajas¹⁷ comparada con la cromatografía de líquidos, debido a la alta polaridad y baja presión de vapor de los compuestos fenólicos. Además normalmente en la cromatografía de gases se requiere la preparación de un derivado para la determinación de compuestos fenólicos. La acetilación con anhídrido acético es el tipo de derivatización más usada para los fenoles.

1.3.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La mayoría de las aplicaciones de la cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de compuestos fenólicos se enfocan al análisis de los mismos en muestras acuosas. Pero hay otras aplicaciones en muestras como sedimentos, aceites, incluso miel^{17, 18, 19, 20, 21}.

La cromatografía de líquidos de alta resolución se utiliza para la determinación de mezclas complejas de compuestos fenólicos, pero cuando las concentraciones de los compuestos fenólicos son bajas, es necesario llevar a cabo una etapa de extracción líquido-líquido o de extracción en fase sólida, y en ocasiones una etapa de destilación.

Con relación a los detectores, el más utilizado es el detector ultravioleta-visible. También se han utilizado detectores electroquímicos, con mediciones amperométricas y coulombimétricas²².

1.4 Antecedentes

Dentro de los numerosos trabajos que aparecen en la literatura para determinar compuestos fenólicos en muestras acuosas, por su relevancia podemos citar los siguientes:

Becerra y colaboradores desarrollaron y validaron un método de HPLC para el análisis de clorofenoles en muestras de reactores anaeróbicos para el tratamiento de aguas residuales. El método fue utilizado para cuantificar pentaclorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol. Se utilizó un detector UV²³.

Cledera Castro y colaboradores desarrollaron y validaron un método de HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) para el análisis de fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol y 2-metil-4,6-dinitrofenol usando una columna monolítica. El método se aplicó a muestras de aguas residuales de varias industrias, entre ellas, la industria petroquímica²⁴.

Ali y Aboul-Enein desarrollaron un método de HPLC-UV para el análisis de 4-cianofenol, fenol, 4-nitrofenol y 4-clorofenol en aguas de desecho. La columna utilizada fue una columna monolítica de sílice²⁵.

Marengo y colaboradores desarrollaron y validaron un método de HPLC para la separación de fenol, tres nitrofenoles y cinco clorofenoles. Los parámetros que siguieron para la validación fueron: precisión, exactitud, linealidad, límites de detección y cuantificación²⁶.

En el año 2001, Gryniewicz y col. determinaron compuestos fenólicos en muestras de agua de escurrimiento urbano pluvial en Polonia. Utilizaron LLE-HPLC-UV-DAD y una columna C18. Emplearon calibración de estándar externo y reportaron recuperaciones de 85 a 95% y límites de detección en el rango de 2×10^{-4} - 5×10^{-4} microgramos/microlitro.¹⁵

La literatura nos muestra que también se ha trabajado en el desarrollo y validación de métodos cromatográficos para determinar compuestos fenólicos en matrices diferentes al agua. Enseguida se mencionan algunos ejemplos.

Muna y col. en el año 2004 emplearon una columna C18 para separar fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol, 4-clorofenol y pentaclorofenol mediante HPLC con detección amperométrica. La separación completa se realizó en 16 minutos. La matriz utilizada para el estudio fue suelo. El rango lineal fue de 2 a 3 órdenes de magnitud. Se reportaron límites de cuantificación para los analitos de 0.1 a 0.5 nanogramos.²²

Gyorik y col. en el año 2003 desarrollaron un método para determinar fenol en miel por HPLC con detección de fluorescencia. Utilizaron una columna C18 y midieron a una longitud de onda de 270 nm. Encontraron un tiempo de retención para el fenol de 14.1 minutos. Reportaron 98% de recuperación y un límite de cuantificación del fenol de 5 microgramos/kilogramo. El límite de detección del instrumento HPLC fue de 0.24 ng/mL de fenol.¹⁸

En el año 1996, Bennet y col. desarrollaron un método para la determinación de fenol y alquilfenoles en agua y aceites derivados del petróleo. Utilizaron SPE y HPLC con detector electroquímico. Además de SPE, se empleó extracción alcalina para hacer una comparación de ambas. Fueron necesarios 25 minutos para la separación de los analitos.¹⁹

En el año 2001, Mateos y col. reportaron un método para determinar fenoles y otros compuestos en aceites de oliva. Emplearon SPE y HPLC con detector de arreglo de diodos. Los resultados mostraron recuperaciones de hasta 90%. Además hicieron una comparación de la extracción líquido-líquido con la SPE y se encontró que no había diferencias significativas entre ambos tipos de extracción. Se requirieron 60 minutos para el análisis.²⁰

En el año 2003, Ziaková y col. validaron un método de HPLC para la determinación de compuestos fenólicos presentes en la familia de plantas *Lamiales*. Se utilizaron columnas C18 y C8 de varios fabricantes. El detector utilizado fue de arreglo de diodos. Para la preparación de la muestra se realizaron extracciones con agua a pH ácido. Reportaron que las columnas C18 fueron adecuadas para la separación de los analitos investigados. Los parámetros validados fueron: repetibilidad de tiempos de retención, intersección y pendiente de la curva de calibración, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación. La separación de los analitos se llevó a cabo en 30 minutos.²¹

En el año 2007, Zhao Ru Song y col. desarrollaron un método de purga y trampa acoplado con cromatografía de gases para el análisis de trazas de compuestos fenólicos. El método se basó en la derivatización con anhídrido acético. Se investigaron los parámetros que afectaban la eficiencia de extracción como, concentración y tiempo de purga y volumen de agente de derivatización. El rango lineal encontrado para los compuestos fenólicos fue de 0.2 a 100 µg/L. Los límites de detección que se encontraron van de 0.08 a 0.15 µg/L. El método se aplicó a muestras de aguas naturales obteniendo porcentajes de recuperación de 72.9 a 84.2%.²⁷

En el año 2007, Natercia y col. desarrollaron y validaron un método de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas para determinar 10 compuestos fenólicos en muestras de agua. El método validado es adecuado para el análisis de agua potable. Las dos últimas referencias resultan interesantes para nuestro trabajo debido a que nos muestra que algunos de los trabajos más recientes de validación de métodos están relacionados a cromatografía de gases y no a validaciones enfocadas a la cromatografía de líquidos.⁵

En el año 2007, Ye y col. desarrollaron un método de microextracción en fase líquida con headspace acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de compuestos fenólicos en muestras de aguas ambientales. Se determinaron compuestos como 2-nitrofenol, 4-clorofenol y 2,4-diclorofenol. Reportaron límites de detección de 0.3 a 0.5 µg/L y porcentajes de recuperación de 89.4-99.2%.²⁸

Tomando en cuenta que trabajos anteriores no han realizado una validación para una variedad tan amplia de compuestos fenólicos haciendo uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución y en vista de la gran importancia que tiene el uso de métodos validados para asegurar la calidad de los resultados obtenidos en toda investigación, se plantearon los objetivos para el presente trabajo, en el cual se pretende desarrollar y validar un método cromatográfico para la separación y cuantificación de 11 compuestos fenólicos, mismo listado citado por la EPA en su método 604.

1.5 Preparación de muestras

Una parte importante en cualquier desarrollo analítico es la preparación de la muestra, ya que de ella depende en gran parte la precisión y la exactitud de un método.

Cuando el contenido del analito en la muestra se encuentra por debajo del límite de detección es necesario utilizar métodos de preconcentración previos al análisis. De esta 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.

Dentro de las técnicas de preparación más empleadas para el análisis de compuestos fenólicos se encuentran:

- Extracción líquido-líquido
- Extracción en fase sólida

1.6 Justificación

Después de haber revisado la literatura anteriormente citada, encontramos que diversos autores han trabajado con una amplia gama de compuestos fenólicos, pero hasta el momento no se ha validado un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de los 11 compuestos fenólicos contaminantes prioritarios.

Tomando en cuenta lo anterior el presente trabajo se enfocó en el desarrollo y validación de un método cromatográfico para la separación y cuantificación de 11 compuestos fenólicos, mismo listado citado por la EPA en su método 604.

Por todo lo anterior se propusieron la siguiente hipótesis y objetivos.

1.6.1 HIPÓTESIS

El desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector UV permite la separación y cuantificación de 11 compuestos fenólicos en muestras de agua.

1.6.2 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector UV para la determinación de 11 compuestos fenólicos en muestras de agua.

1.6.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones de operación adecuadas para lograr la separación y cuantificación de 11 compuestos fenólicos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV).
2. Validar el sistema cromatográfico de HPLC-UV.
3. Seleccionar el método de extracción más adecuado para el tratamiento de la muestra: extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida.
4. Validar el método completo: extracción-HPLC-UV.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipo, material y reactivos

2.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos Perkin Elmer Series 200, sistema de bombeo cuaternario y detector UV Series 200.
- Balanza Analítica
- Bomba de vacío

2.1.2 Materiales

- Columna Phenomenex Gemini, C18, 250 X 4.6 mm, 5 μ m
- Columna Phenomenex Luna C8, 150 X 4.6 mm, 5 μ m
- Microjeringas Hamilton de 10, 25, 50, 100 y 500 μ L
- Cartuchos de extracción en fase sólida Strata C-18-E, 500 mg / 12 mL
Phenomenex
- Sistema de filtración de solventes Milipore
- Matracas de aforación de 1, 10, 250, 500 y 1000 mL

- Vasos de precipitados de 10, 50 y 250 mL
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 mL
- Embudo de separación de 250 mL
- Pinzas para soporte
- Anillo para soporte
- Viales de vidrio de 4 mL con tapón de rosca
- Viales de vidrio de 20 mL con tapón de rosca
- Papel filtro Wathman No. 41
- Guantes de nitrilo

2.1.3 Reactivos

- Mezcla certificada de 11 compuestos fenólicos, 500 – 2500 μ g/ml (No. Catálogo 48859), Supelco
- Kit de fenoles sólidos EPA 604, Chem Service (No. Catálogo PP-2N)
- Cloruro de metileno grado HPLC, Fermont
- Acetonitrilo grado HPLC, TEDIA
- Metanol grado HPLC, Fermont
- Ácido Acético Glacial Grado HPLC, J.T. Baker
- Agua destilada
- Sulfato de sodio grado ACS, J.T. Baker
- Papel aluminio

2.2 Metodología

2.2.1 Preparación de soluciones

Para preparar las soluciones de trabajo empleadas en las pruebas para encontrar condiciones de separación se partió del kit de fenoles sólidos, el cual constaba de los 11 compuestos fenólicos en forma individual. A partir de ellos se prepararon estándares de 2500 ppm. Luego se preparó una dilución secundaria de 100 ppm de cada uno de los analitos. Los analitos se disolvieron en metanol grado HPLC utilizando material volumétrico. Todas las soluciones se guardaron en viales de vidrio ámbar con tapón de rosca cubiertos con papel aluminio, debido a que los compuestos fenólicos se degradan con la luz, además se mantuvieron en refrigeración.

Para llevar a cabo las validaciones, tanto del sistema como del método cromatográfico, se utilizó la mezcla certificada de los 11 compuestos fenólicos que contenía los analitos en niveles de 500 – 2500 ppm. Se preparó una disolución primaria con concentraciones de 100 – 500 ppm, ésta fue la solución de trabajo para la validación del sistema. De la dilución primaria se preparó una dilución secundaria para obtener concentraciones de 1 – 5 ppm, ésta última disolución se utilizó para preparar las muestras para las extracciones y la validación del método.

TABLA 2.
 CONCENTRACIONES EN PPM DE LOS DIFERENTES ANALITOS EN LOS
 8 NIVELES

Analito	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6	Nivel 7	Nivel 8
Fenol	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
4-nitrofenol	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0
2-nitrofenol	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
2-clorofenol	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
2-metil-4,6-dinitrofenol	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0
2,4-dimetilfenol	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
4-cloro-3-metilfenol	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0
2,4-diclorofenol	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0
2,4-dinitrofenol	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	10.5	12.0	15.0
2,4,6-triclorofenol	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	10.5	12.0	15.0
pentaclorofenol	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	25.0

2.2.2 Condiciones cromatográficas

Para determinar los parámetros cromatográficos de la separación, se realizaron ensayos con diferentes composiciones de fase móvil y flujo. También se realizaron pruebas para determinar el tipo de elución a utilizar: isocrática o gradiente.

2.3 Validación del sistema cromatográfico

2.3.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad se prepararon soluciones estándares de calibración a 8 niveles de concentración por triplicado (tabla 2), las cuales fueron analizadas por HPLC-UV. Una vez obtenidos los resultados, se realizó el análisis de regresión por mínimos cuadrados y se elaboró la curva de calibración correspondiente graficando la respuesta (área) en función de la concentración. Se calcularon los factores de respuesta (F.R.) para cada estándar y se determinó la desviación estándar relativa (RSD) para cada factor (Ver ecuaciones 1 y 2):

$$\text{F.R.} = \text{Respuesta del detector} / \text{concentración del estándar} \quad (\text{ecuación 1})$$

$$\text{RSD} = (\text{SD} \times 100) / \text{promedio de F.R.} \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde:

RSD = Desviación estándar relativa

SD = Desviación estándar de los factores de respuesta

Para determinar la linealidad, el criterio de aceptación es que RSD debe ser menor a 20%²⁹. En lo que se refiere a la curva de calibración para cada compuesto fenólico, el valor del coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual a 0.995, o el coeficiente de determinación (r²) debe ser mayor o igual a 0.990³⁰. Además se utilizó la prueba t de acuerdo con Miller y Miller³¹ para confirmar que hay correlación entre “x” e “y”, que en nuestro caso son concentración y área respectivamente.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde:

r = coeficiente de correlación

n = número de niveles utilizados en la curva de calibración

Para esta prueba t la hipótesis nula es que no existe correlación entre “x” e “y”. El valor de t calculado se compara con el valor tabulado a un nivel de significación P = 0.01, utilizando un contraste de dos colas y (n-2) grados de libertad. Si el valor de t calculado es mayor que el valor tabulado, se rechaza la hipótesis nula y se concluye en tal caso que hay una relación significativa entre “x” e “y”.

2.3.2 Precisión

Para evaluar la precisión del sistema se emplearon estándares preparados por triplicado a 8 niveles de concentración (tabla 2), se calculó el promedio y la desviación estándar relativa para cada nivel de concentración. La precisión se expresa con la desviación estándar relativa y para este trabajo se estableció como criterio de aceptación que el RSD sea menor de 15%²⁹.

2.3.3 Exactitud

Este parámetro se validó durante las extracciones realizadas para la preparación de la muestra. Se trabajó con muestras de agua a las cuales se les adicionaron los 11 analitos de modo que su nivel de concentración correspondiese al nivel 1 de la tabla 3 y se calcularon los porcentajes de recuperación y sus desviaciones estándares relativas. Como criterio de aceptación se estableció que la desviación del valor real no debe exceder del 20%²⁹. También se determinaron los límites de confianza para la media a un nivel de confianza del 95%.

TABLA 3.
 CONCENTRACIONES EN PPM DE LOS ANALITOS EN LAS MUESTRAS
 DE AGUA PREPARADAS PARA VALIDACIÓN DEL MÉTODO
 CROMATOGRÁFICO

Analito	Nivel	Nivel	Nivel	Nivel	Nivel	Nivel	Nivel	Nivel
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fenol	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040	0.050
4-nitrofenol	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150	0.175	0.200	0.250
2-nitrofenol	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040	0.050
2-clorofenol	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040	0.050
2-metil-4,6-dinitrofenol	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150	0.175	0.200	0.250
2,4-dimetilfenol	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040	0.050
4-cloro-3-metilfenol	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150	0.175	0.200	0.250
2,4-diclorofenol	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.035	0.040	0.050
2,4-dinitrofenol	0.030	0.045	0.060	0.075	0.090	0.105	0.120	0.150
2,4,6-triclorofenol	0.030	0.045	0.060	0.075	0.090	0.105	0.120	0.150
pentaclorofenol	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150	0.175	0.200	0.250

2.3.4 Límite de detección

El límite de detección es definido como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede ser detectada, no necesariamente cuantificada. Para evaluar los límites de detección para cada analito se utilizaron las curvas de calibración preparadas por triplicado (tabla 2). En este trabajo se aplicó el criterio Miller y Miller³¹ para calcular los límites de detección.

$$\text{Límite de detección} = y_B + 3S_B \quad (\text{ecuación 4})$$

Donde:

y_B = señal del blanco

S_B = desviación estándar del blanco

2.3.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación²⁸ se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede ser determinado con exactitud y precisión aceptables bajo las condiciones del método. Para calcular los límites de cuantificación se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Límite de cuantificación} = y_B + 10 S_B \quad (\text{ecuación 5})$$

Donde:

y_B = señal del blanco

S_B = desviación estándar del blanco

El criterio de aceptación es que el límite de cuantificación del método para cada compuesto sea inferior o igual al estándar de más baja concentración utilizado para la gráfica de calibración.

2.3.6 Intervalo de trabajo

Se buscó trabajar en un intervalo de trabajo que permitiera determinar niveles de concentración para cada analito en los cuales se incluyan los límites máximos permisibles establecidos por la normatividad mexicana correspondiente. Mediante el uso de los factores de calibración se seleccionó la zona de linealidad del intervalo propuesto.

2.4 Selección del método de extracción

2.4.1 Metodología general para la extracción en fase sólida

Se prepararon muestras partiendo de agua de grifo y agregando los analitos. Las muestras preparadas tenían un volumen total de 100 mL. Se agregó 1 mL de la mezcla de compuestos fenólicos de la dilución secundaria y se aforó a 100 mL en un matraz volumétrico de manera que las concentraciones se encontraran en un rango de 0.01–0.05 ppm.

Se montó el equipo de extracción, los cartuchos fueron acondicionados con 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. Luego se hicieron pasar las muestras por el cartucho, se sometió a vacío, después de haber pasado la muestra en su totalidad, se lavó el cartucho con 2 mL de agua destilada y se mantuvo el vacío hasta sequedad. Después

se recuperaron los analitos con 3 porciones de 3 mL de metanol grado HPLC. Después de esto, se concentró la muestra a 1 mL, para obtener finalmente un factor de concentración de 100, de modo que la concentración de inyección de los analitos fuera de 1 a 5 ppm (Nivel 1 de las curvas de calibración). Se hicieron 7 réplicas.

2.4.2 Metodología general de la extracción líquido-líquido

Se prepararon muestras de forma similar como se mencionó en la metodología de extracción en fase sólida. Se colocó la muestra en un embudo de separación de 250 mL, se agregaron 15 mL de cloruro de metileno, se agitó durante 1 minuto en la campana de extracción y se liberó el gas producido, se dejó reposar durante 20 minutos. Se realizaron un par de extracciones más con 10 mL de cloruro de metileno cada una. Los extractos fueron colectados y combinados en un vaso de precipitado. Para eliminar el agua que aún quedaba en la muestra se agregó sulfato de sodio anhidro, después se filtró en papel Wathman No. 41, se recibió el filtrado en un vaso de precipitado. Se dejó volatilizar el solvente en la campana de extracción. Se recuperó la muestra con 1 mL de metanol grado HPLC y así tener un factor de concentración de 100. Se hicieron 3 réplicas.

2.5 Validación del método: extracción-HPLC-UV

Después de que se seleccionó el método de extracción más adecuado, se validó el método completo usando muestras preparadas en el laboratorio a 8 niveles de concentración (tabla 2). Al igual que en la validación del sistema, se evaluó la linealidad y la precisión y se determinaron los límites de detección y cuantificación para cada analito.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Condiciones de Separación

Como se mencionó en los objetivos, la primera parte del proyecto consistió en encontrar las condiciones adecuadas para la separación de los 11 compuestos fenólicos. Se probó elución isocrática, elución por gradiente, diferentes solventes como fase móvil y diferentes proporciones de los mismos. También se trabajó con diferentes velocidades de flujo. Se obtuvieron resultados preliminares donde la separación no era satisfactoria o el tiempo requerido para la separación cromatográfica era muy largo (60 minutos) y se deseaba reducirlo. Finalmente se llegó a las condiciones mostradas en la tabla 4.

TABLA 4.
CONDICIONES FINALES PARA LA SEPARACIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS

Fase Móvil	A: Metanol – HOAc 1%, B: H ₂ O- HOAc 1%
Velocidad de Flujo	1.5 mL/min
Elución por gradiente	40% Metanol hasta alcanzar 100% en 25 minutos
Longitud de onda utilizada	280 nm
Tiempo de corrida	25 minutos
Volumen de inyección	20 μ L
Columna	C 8

La figura 2 muestra un cromatograma obtenido con las condiciones de operación finales por HPLC-UV para una mezcla de 11 compuestos fenólicos, el primer compuesto eluye a los 3.5 minutos y el último a 21.4 minutos.

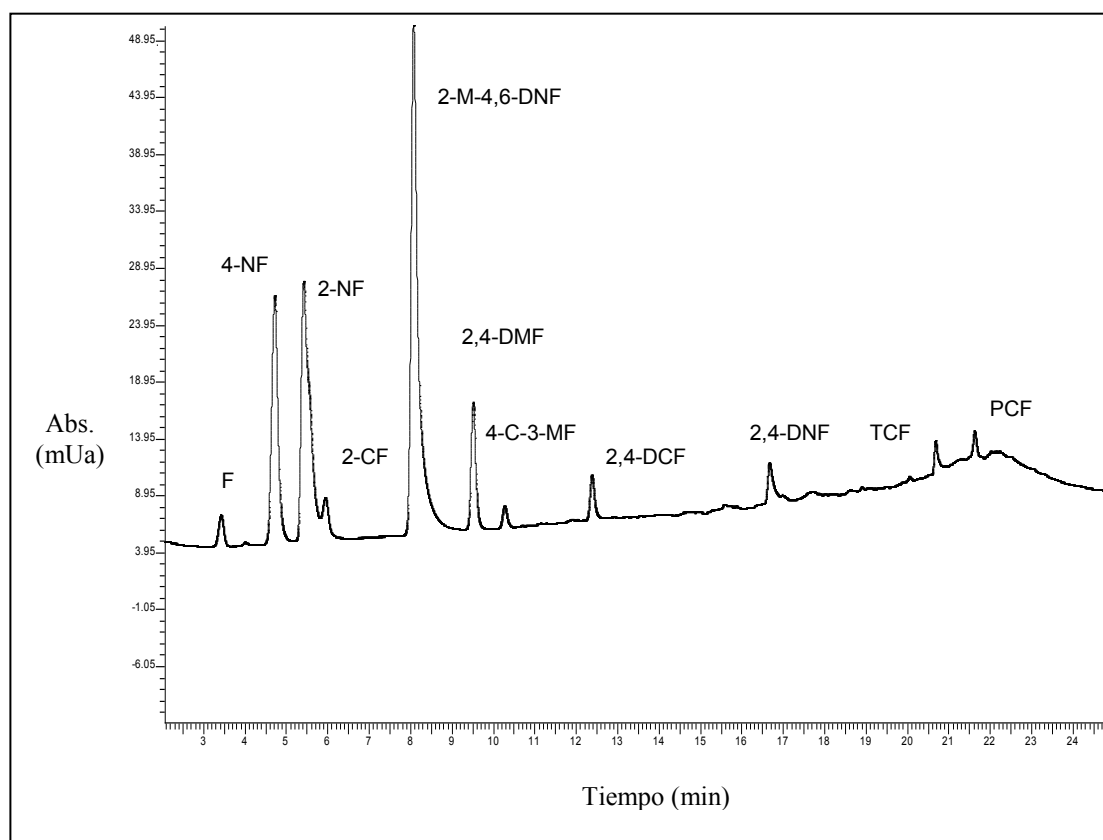


Figura 2. Cromatograma de 11 compuestos fenólicos obtenido por HPLC-UV en las condiciones de operación finales

La tabla 5 presenta los tiempos de retención para cada uno de los 11 compuestos fenólicos.

TABLA 5.
TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS ESTABLECIDAS.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Fenol	3.5
4-nitrofenol	5.0
2-nitrofenol	5.3
2-clorofenol	5.8
2-metil-4,6-dinitrofenol	8.2
2,4-dimetilfenol	9.3
4-cloro-3-metilfenol	10.1
2,4-diclorofenol	12.3
2,4-dinitrofenol	16.5
2,4,6-triclorofenol	20.2
pentaclorofenol	21.4

3.2 Validación del sistema cromatográfico

La tabla 6 presenta los resultados obtenidos de la validación instrumental por HPLC-UV, incluye el intervalo de trabajo utilizado para construir las curvas de calibración, el coeficiente de correlación de la curva de calibración como parámetro de linealidad, los resultados de la prueba t, la desviación estándar relativa como medida de la precisión, los límites de detección (LD), los límites de cuantificación (LC), así como los resultados de desviación estándar relativa de los factores de respuesta, que es otro parámetro para evaluar la linealidad.

TABLA 6.
 RESULTADOS OBTENIDOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA
 CROMATOGRÁFICO

Analito	Intervalo de conc. µg/mL	Precisión (RSD)	Factores de Respuesta (RSD)	Coefficiente de Correlación (r)	Valor de t calculada	LD µg/mL	LC µg/mL
Fenol	1.0 –5.0	1.84	3.53	0.998	38.80	0.25	0.75
4-nitrofenol	5.0–25.0	4.59	3.26	0.999	54.74	1.79	5.42
2-nitrofenol	1.0- 5.0	4.96	4.50	0.999	54.74	0.21	0.65
2-clorofenol	1.0- 5.0	5.05	6.81	0.997	31.55	0.31	0.92
2-metil-4,6-dinitrofenol	5.0–25.0	2.63	3.05	0.999	54.74	0.94	2.86
2,4-dimetilfenol	1.0- 5.0	2.79	3.62	0.998	38.80	0.25	0.75
4-cloro-3-metilfenol	5.0–25.0	2.07	14.06	0.996	27.32	0.71	2.15
2,4-diclorofenol	1.5-5.0	3.62	2.65	0.999	54.74	0.49	1.47
2,4-dinitrofenol	6.0-15.0	0.70	14.90	0.995	24.42	1.96	5.94
2,4,6-triclorofenol	4.5-12.0	0.82	18.38	0.992	19.25	1.50	4.55
pentaclorofenol	10.0-20.0	0.89	16.79	0.997	31.55	2.32	7.02

Las curvas de calibración para cada analito se muestran de la figura 3 a la figura 13.

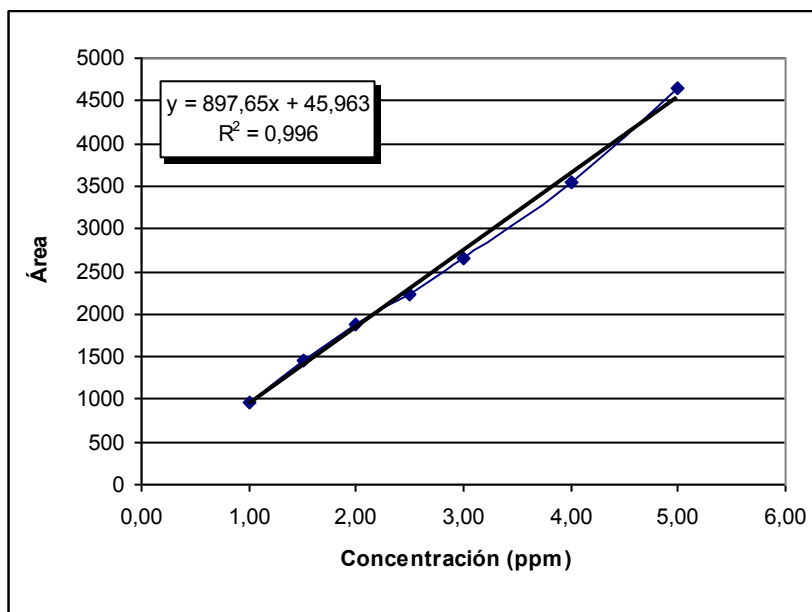


Figura 3. Curva de calibración para Fenol (Validación del sistema cromatográfico)

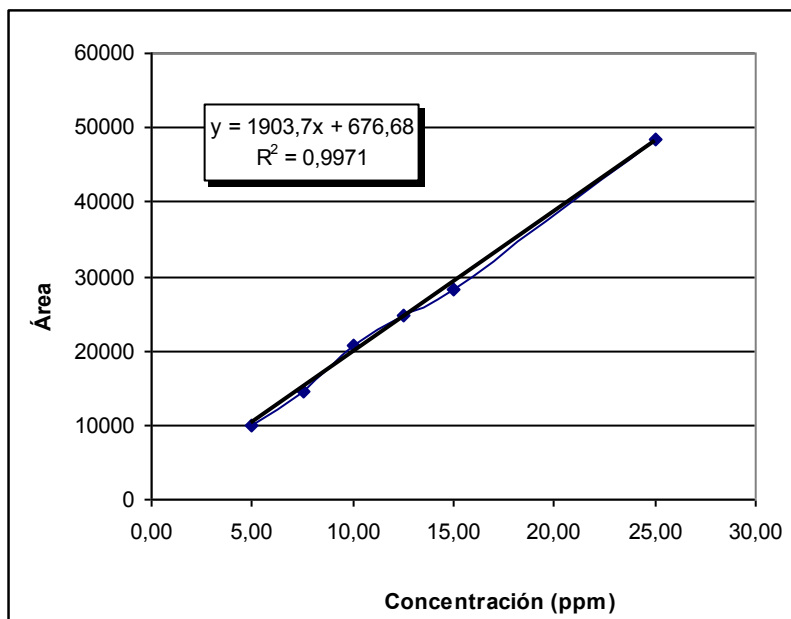


Figura 4. Curva de calibración para 4-NF (Validación del sistema cromatográfico)

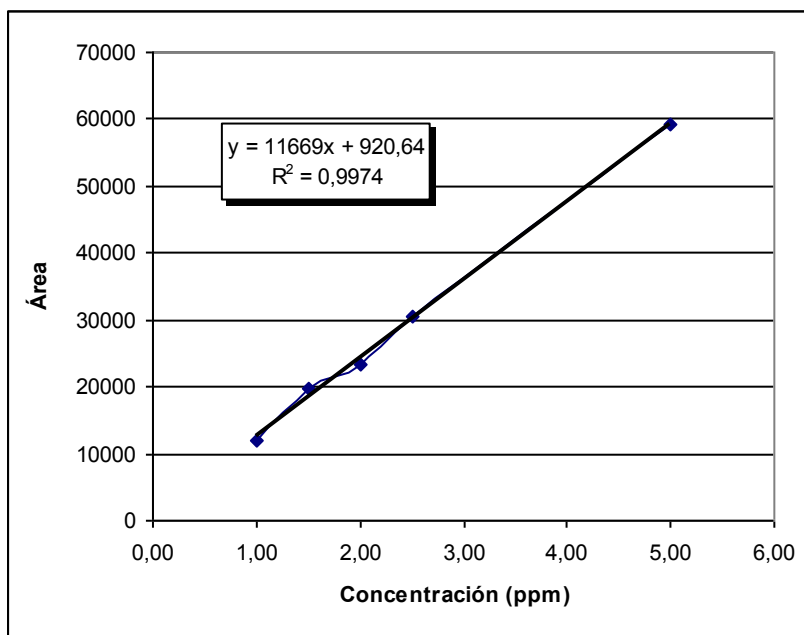


Figura 5. Curva de calibración para 2-NF (Validación del sistema cromatográfico)

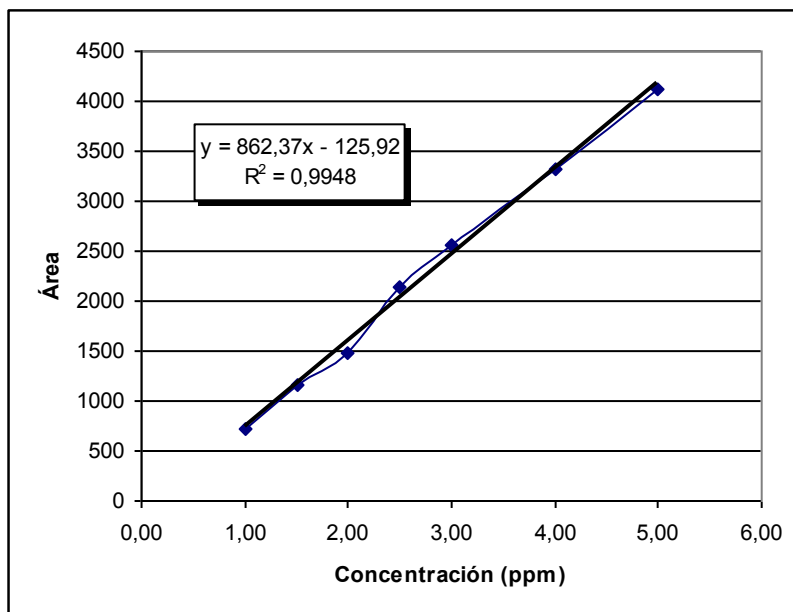


Figura 6. Curva de calibración para 2-CF (Validación del sistema cromatográfico)

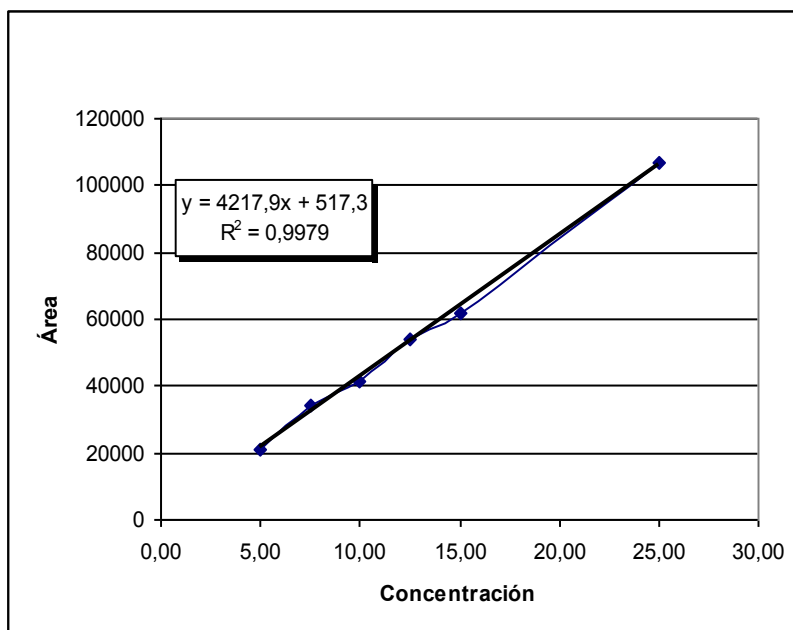


Figura 7. Curva de calibración para 2-M-4,6-DNF (Validación del sistema cromatográfico)

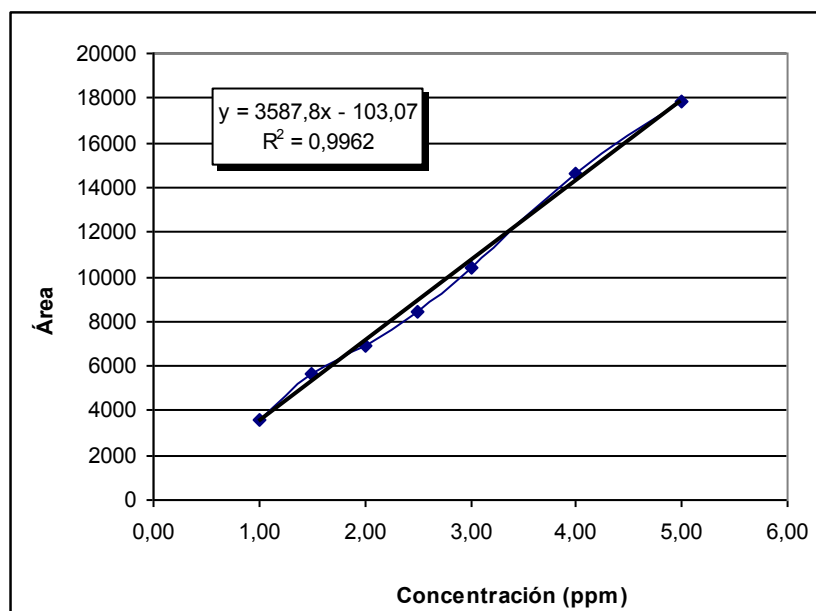


Figura 8. Curva de calibración para 2,4-DMF (Validación del sistema cromatográfico)

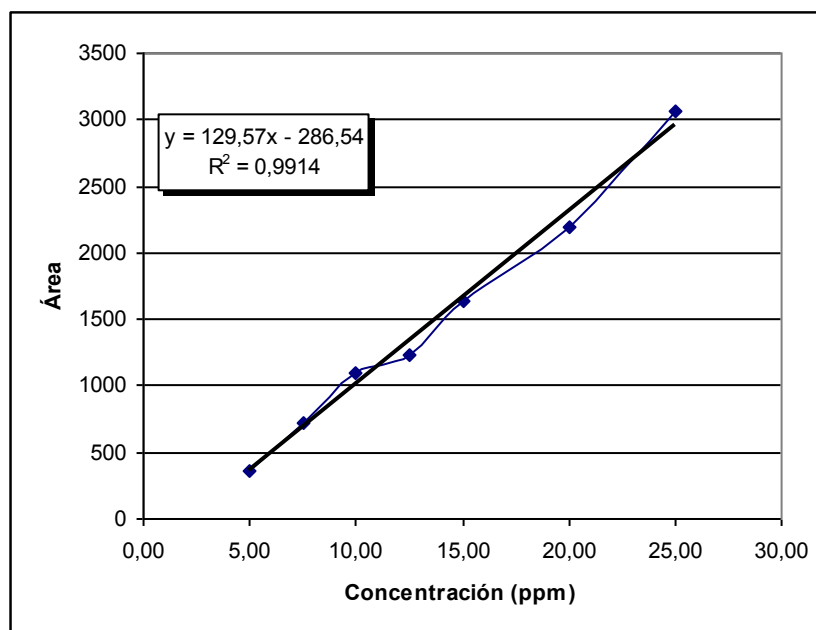


Figura 9. Curva de calibración para 4-C-3-MF (Validación del sistema cromatográfico)

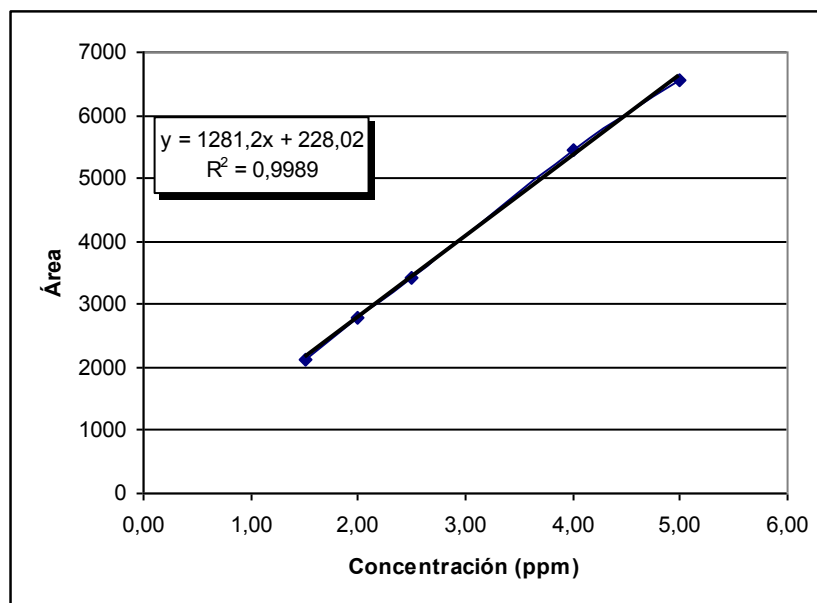


Figura 10. Curva de calibración para 2,4-DCF (Validación del sistema cromatográfico)

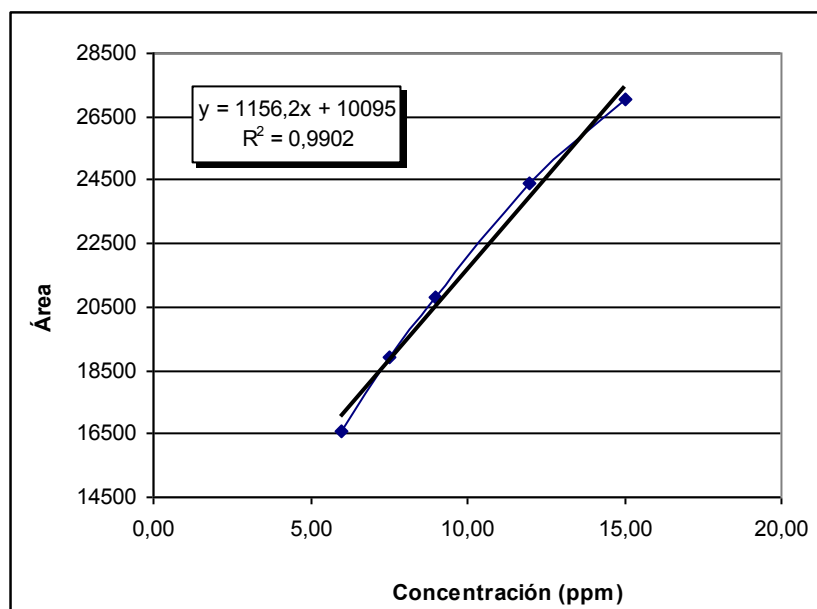


Figura 11. Curva de calibración para 2,4-DNF (Validación del sistema cromatográfico)

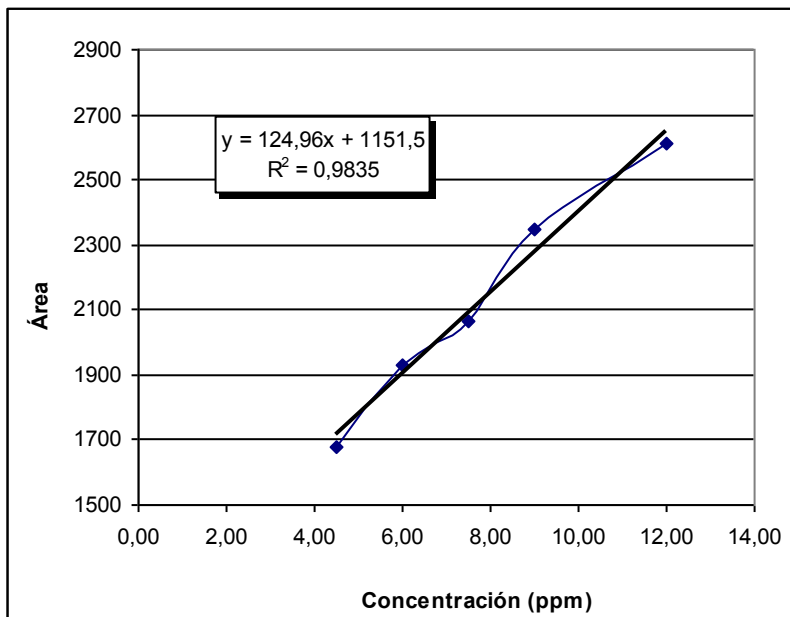


Figura 12. Curva de calibración para TCF (Validación del sistema cromatográfico)

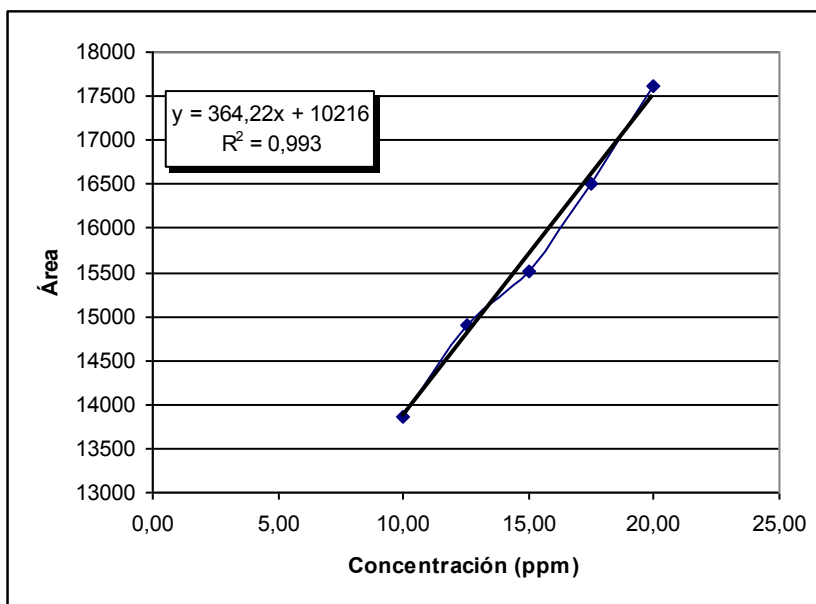


Figura 13. Curva de calibración para PCF (Validación del sistema cromatográfico)

3.3 Selección del método de extracción

3.3.1 Extracción líquido-líquido

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para la extracción líquido-líquido (LLE), las cuales se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos mediante LLE no fueron satisfactorios debido a que 5 analitos no presentaron señal en los cromatogramas después de haber sometido la muestra a LLE, por lo cual en la tabla 7 solamente se muestran porcentajes de recuperación para 6 analitos. En la misma tabla aparecen como ND, los analitos que no presentaron señal. El rango de concentración de los analitos fue de 1 – 5 ppm.

TABLA 7.
PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
UTILIZANDO LLE

Analito	% Recuperación
Fenol	41 %
4-NF	30 %
2-NF	36 %
2-CF	21 %
3-M-4,6-DNF	19 %
2,4-DMF	ND
4-C-3-MF	ND
2,4-DCF	ND
2,4-DNF	ND
TCF	16 %
PCF	ND

3.3.2 Extracción en fase sólida

Los resultados de exactitud y precisión obtenidos para la extracción en fase sólida en cartuchos, para muestras preparadas en el laboratorio con los 11 compuestos fenólicos, a niveles de concentración de 0.01 – 0.05 ppm se expresan como porcentaje de recuperación (%R) y desviación estándar relativa (RSD), respectivamente.

La tabla 8 muestra los resultados mencionados anteriormente. El número de extracciones realizado para llevar a cabo el análisis estadístico fue de 7 extracciones.

TABLA 8.
EXACTITUD (%R) Y PRECISIÓN (RSD) PARA SPE EN CARTUCHOS DE
MUESTRAS PREPARADAS EN LABORATORIO CON LOS 11 COMPUESTOS
FENÓLICOS EN CONCENTRACIONES DE 0.01 – 0.05 PPM

Analito	% R	RSD	Límites de confianza al 95 %
Fenol	97.70	3.25	± 3.32
4-NF	89.14	1.64	± 1.53
2-NF	82.42	1.39	± 1.19
2-CF	90.70	2.81	± 2.66
2-M-4,6-DNF	95.85	2.03	± 2.03
2,4-DMF	98.80	1.88	± 1.94
4-C-3-MF	92.25	2.05	± 1.98
2,4-DCF	94.42	1.59	± 1.57
2,4-DNF	92.57	3.65	± 3.53
TCF	96.85	2.09	± 2.11
PCF	87.85	3.22	± 2.95

3.4 Validación del método de análisis por SPE-HPLC-UV

En la tabla 9 se muestran los parámetros evaluados para la validación del método para la determinación de los compuestos fenólicos por HPLC-UV usando SPE para el tratamiento de la muestra. Se usó agua del grifo y se le agregó cada uno de los 11 analitos en 8 concentraciones. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Se evaluó la linealidad y la precisión, se calcularon los límites de detección y cuantificación del mismo modo que cuando se realizó la validación del sistema cromatográfico.

TABLA 9.
RESULTADOS OBTENIDOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO
CROMATOGRÁFICO

Analito	Intervalo de conc. µg/mL	Precisión (RSD)	Factores de Respuesta (RSD)	Coefficiente de Correlación (r)	Valor de t calculada	LD µg/mL	LC µg/mL
Fenol	0.01 – 0.05	2.03	8.36	0.990	17.64	0.0023	0.0070
4-nitrofenol	0.05 – 0.25	2.11	15.38	0.992	19.25	0.0174	0.0503
2-nitrofenol	0.01 – 0.05	0.91	6.06	0.994	21.38	0.0022	0.0065
2-clorofenol	0.01 – 0.05	2.37	9.73	0.997	31.55	0.0031	0.0092
2-metil-4,6-dinitrofenol	0.05 – 0.25	0.60	4.78	0.996	27.32	0.0038	0.0116
2,4-dimetilfenol	0.01 – 0.05	1.13	7.05	0.990	17.64	0.0009	0.0028
4-cloro-3-metilfenol	0.05 – 0.25	2.40	8.65	0.993	20.59	0.0092	0.0281
2,4-diclorofenol	0.01 – 0.05	2.43	8.65	0.999	54.74	0.0032	0.0097
2,4-dinitrofenol	0.03 -0.15	1.71	18.67	0.999	54.74	0.0106	0.0302
2,4,6-triclorofenol	0.03 – 0.12	2.11	15.38	0.992	19.25	0.0047	0.0149
pentaclorofenol	0.07 – 0.17	0.80	19.22	0.998	38.85	0.0214	0.0650

Las curvas de calibración para cada uno de los analitos se muestran de la figura 14 a la figura 24.

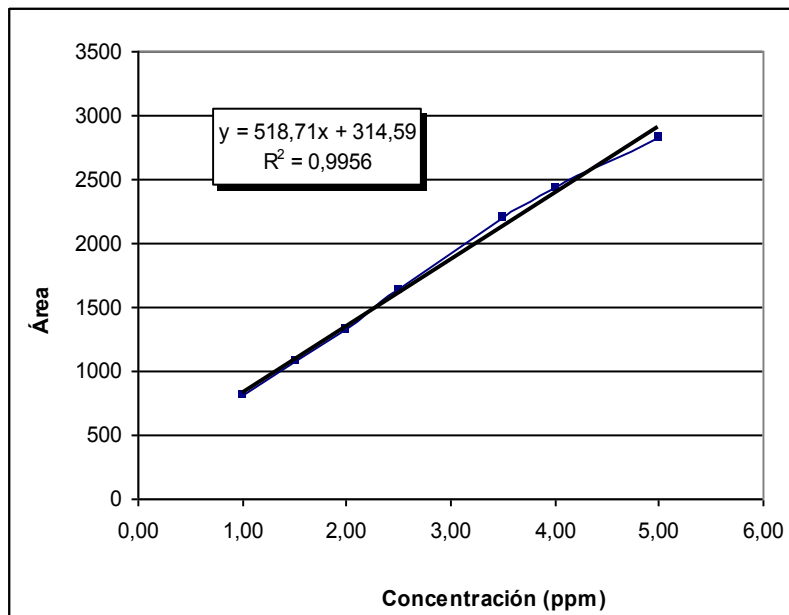


Figura 14. Curva de calibración para Fenol (Validación del método cromatográfico)

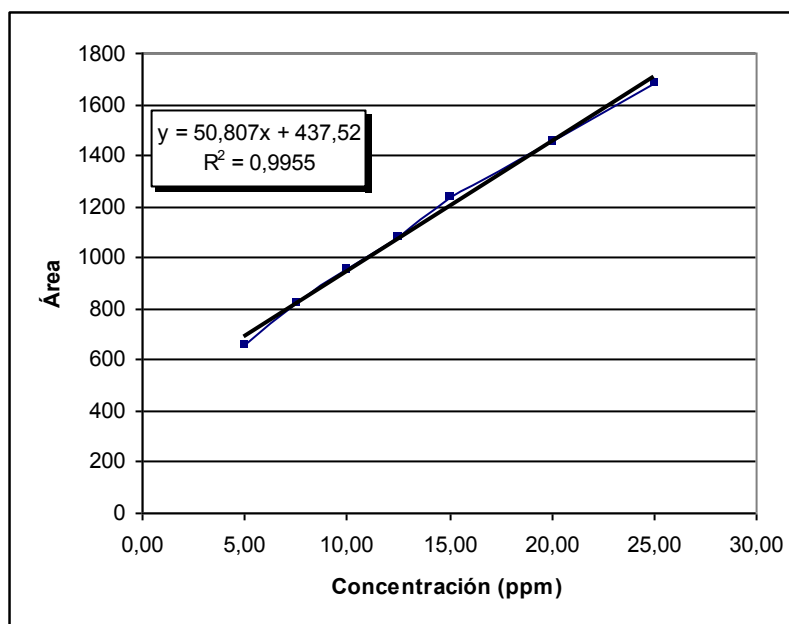


Figura 15. Curva de calibración para 4-NF (Validación del método cromatográfico)

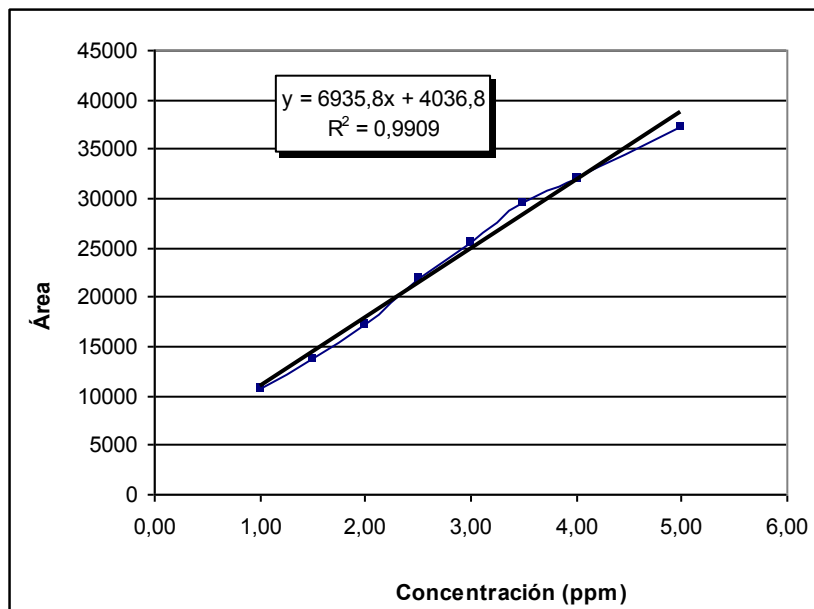


Figura 16. Curva de calibración para 2-NF (Validación del método cromatográfico)

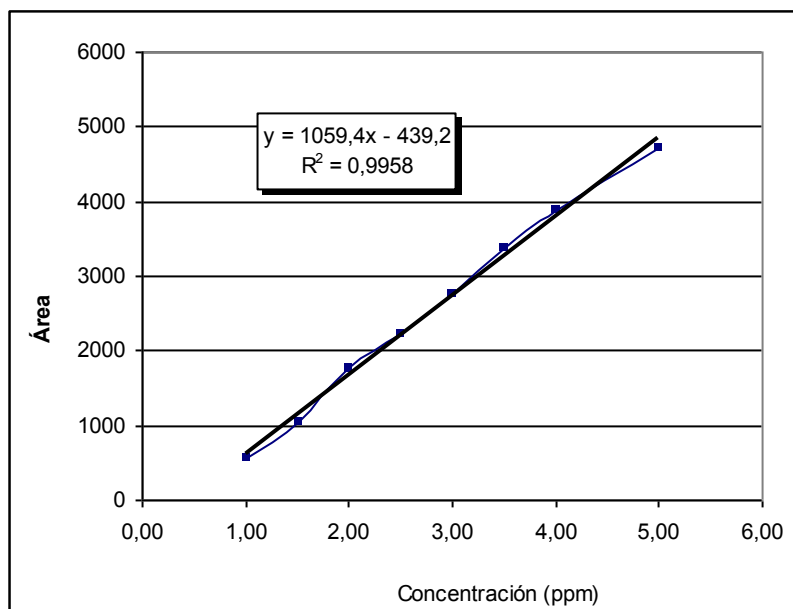


Figura 17. Curva de calibración para 2- CF (Validación del método cromatográfico)

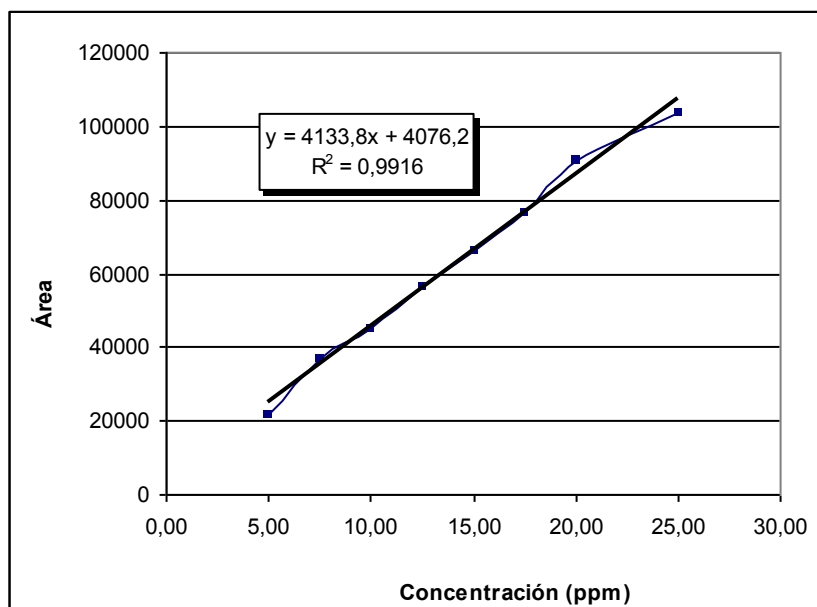


Figura 18. Curva de calibración para 2-M-4,6-DNF (Validación del método cromatográfico)

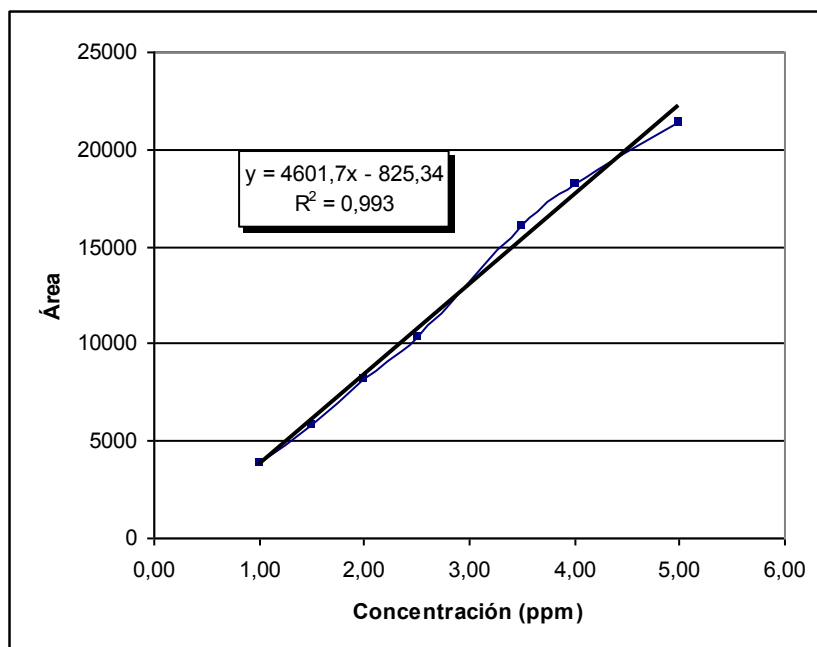


Figura 19. Curva de calibración para 2,4-DMF (Validación del método cromatográfico)

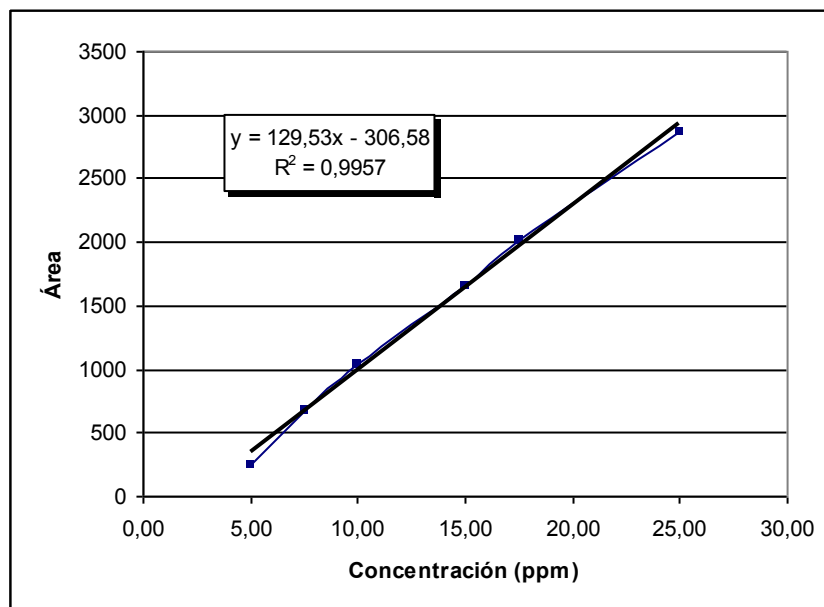


Figura 20. Curva de calibración para 4-C-3-MF (Validación del método cromatográfico)

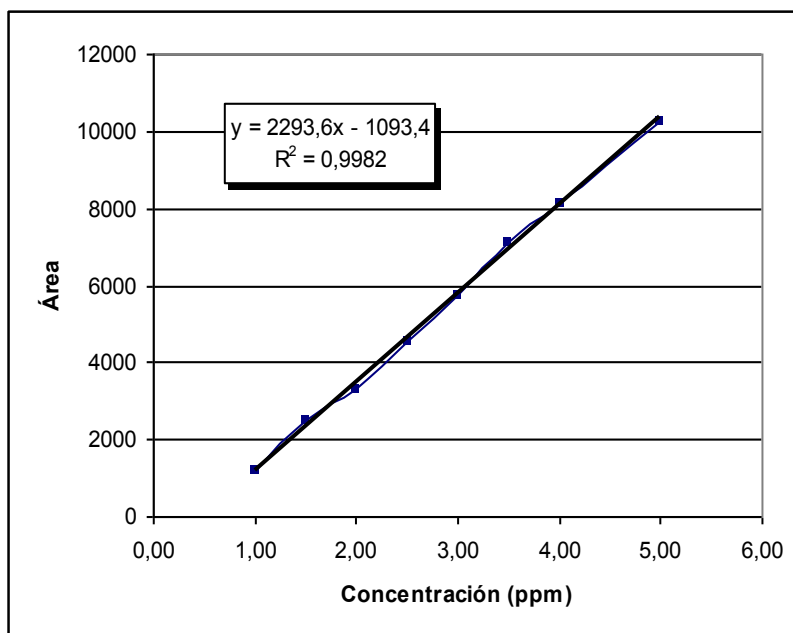


Figura 21. Curva de calibración para 2,4-DCF (Validación del método cromatográfico)

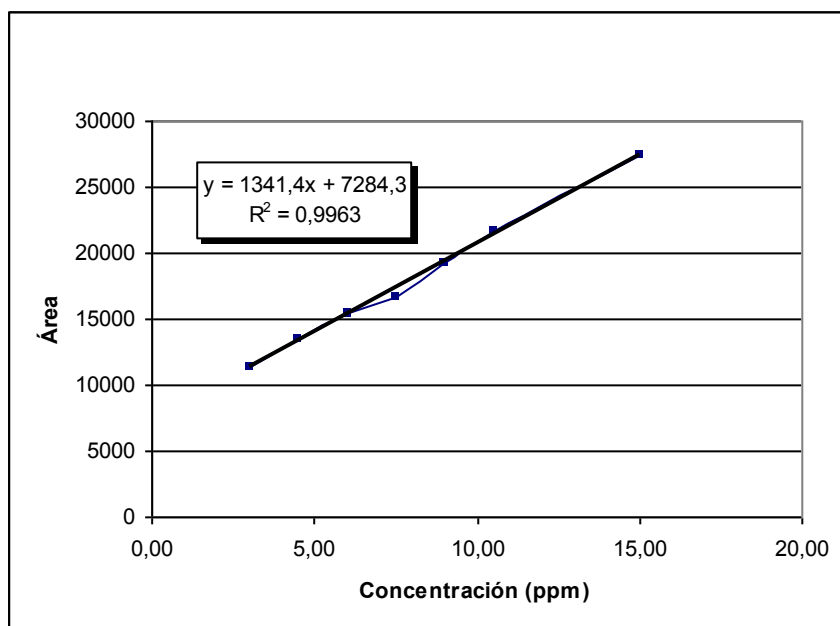


Figura 22. Curva de calibración para 2,4-DNF (Validación del método cromatográfico)

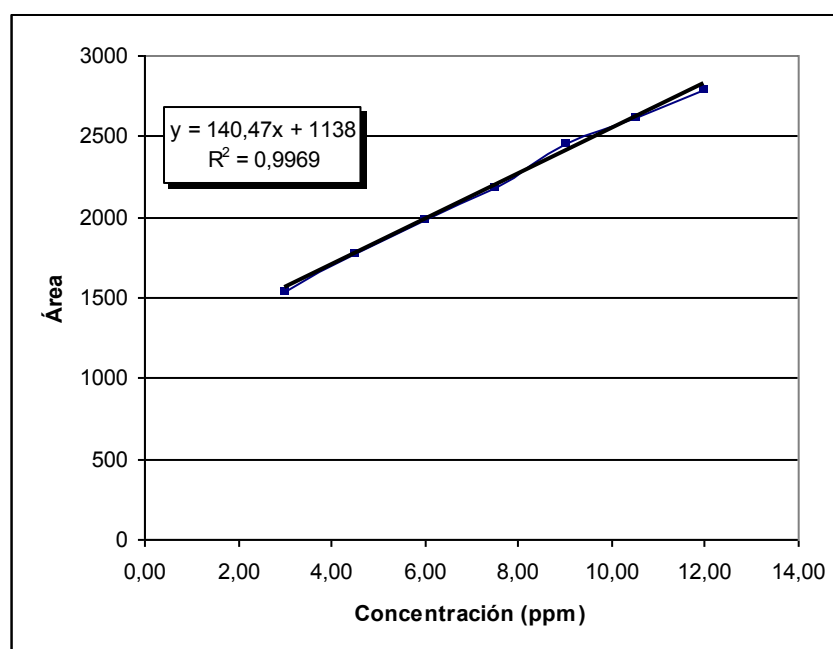


Figura 23. Curva de calibración para TCF (Validación del método cromatográfico)

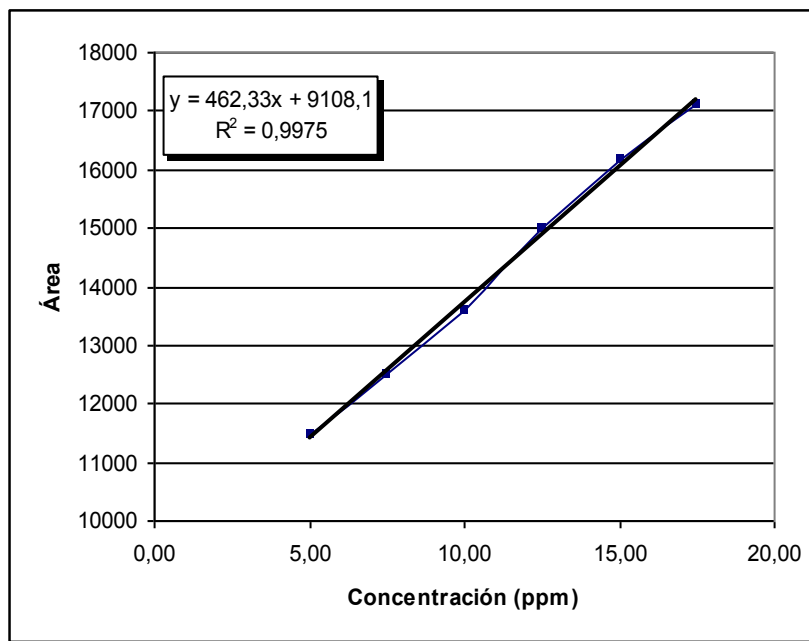


Figura 24. Curva de calibración para PCF (Validación del método cromatográfico)

En la figura 25 se muestra un cromatograma de un blanco.

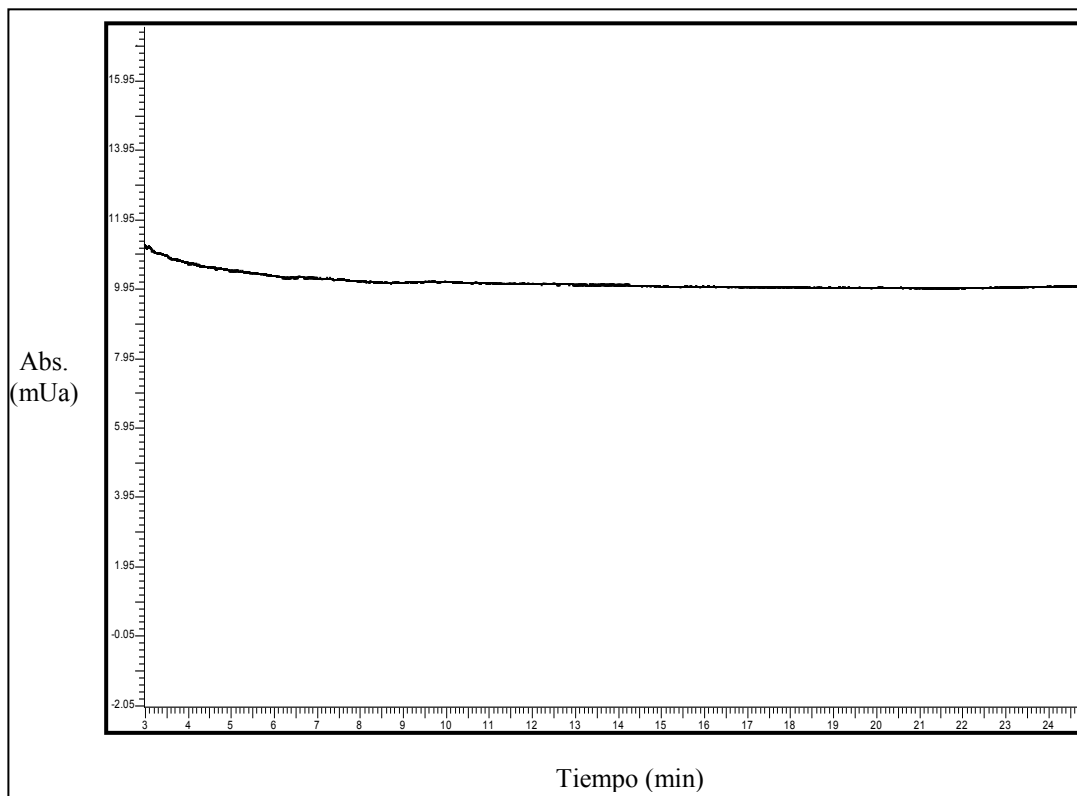


Figura 25. Cromatograma de un blanco (metanol) en las condiciones de operación finales

En la figura 26 se muestra un cromatograma de agua del grifo sin adicionar analito alguno.

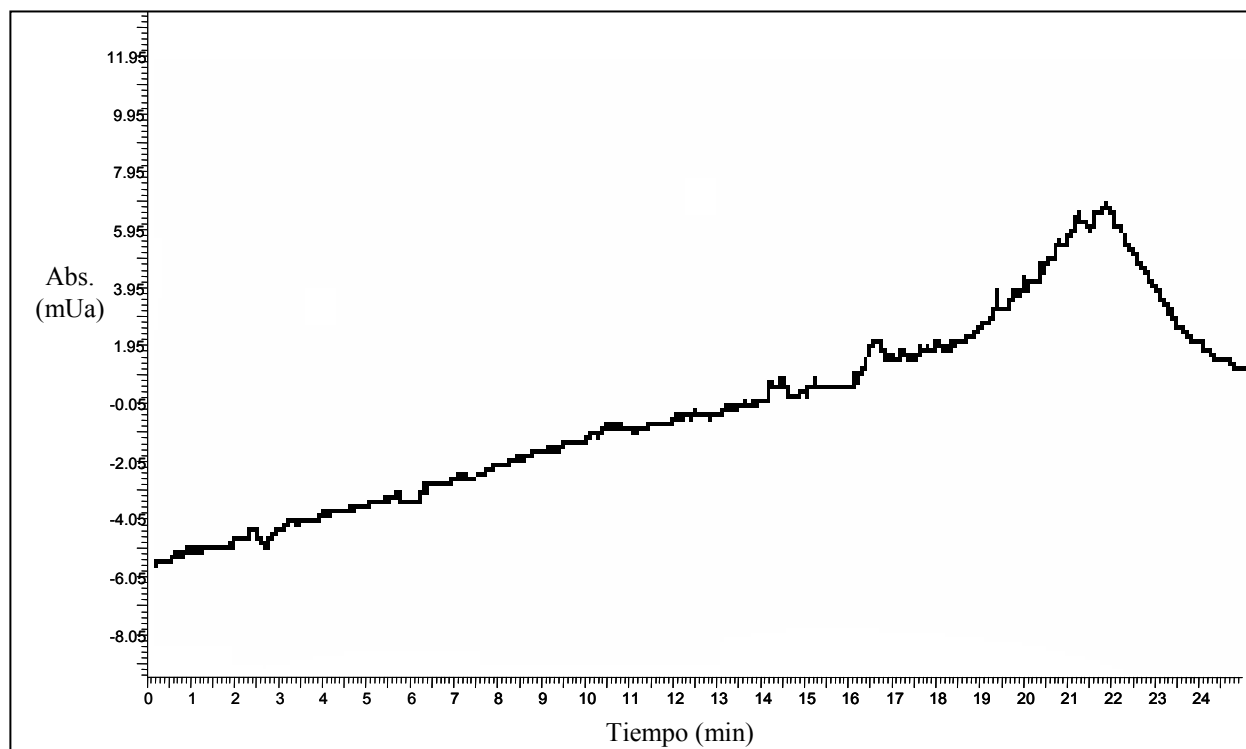


Figura 26. Cromatograma de agua de grifo sin adicionar analitos en las condiciones de operación finales

La figura 27 muestra un cromatograma de una muestra de agua de grifo adicionada con estándares de los 11 compuestos fenólicos. adicionada con estándares de los 11 compuestos fenólicos.

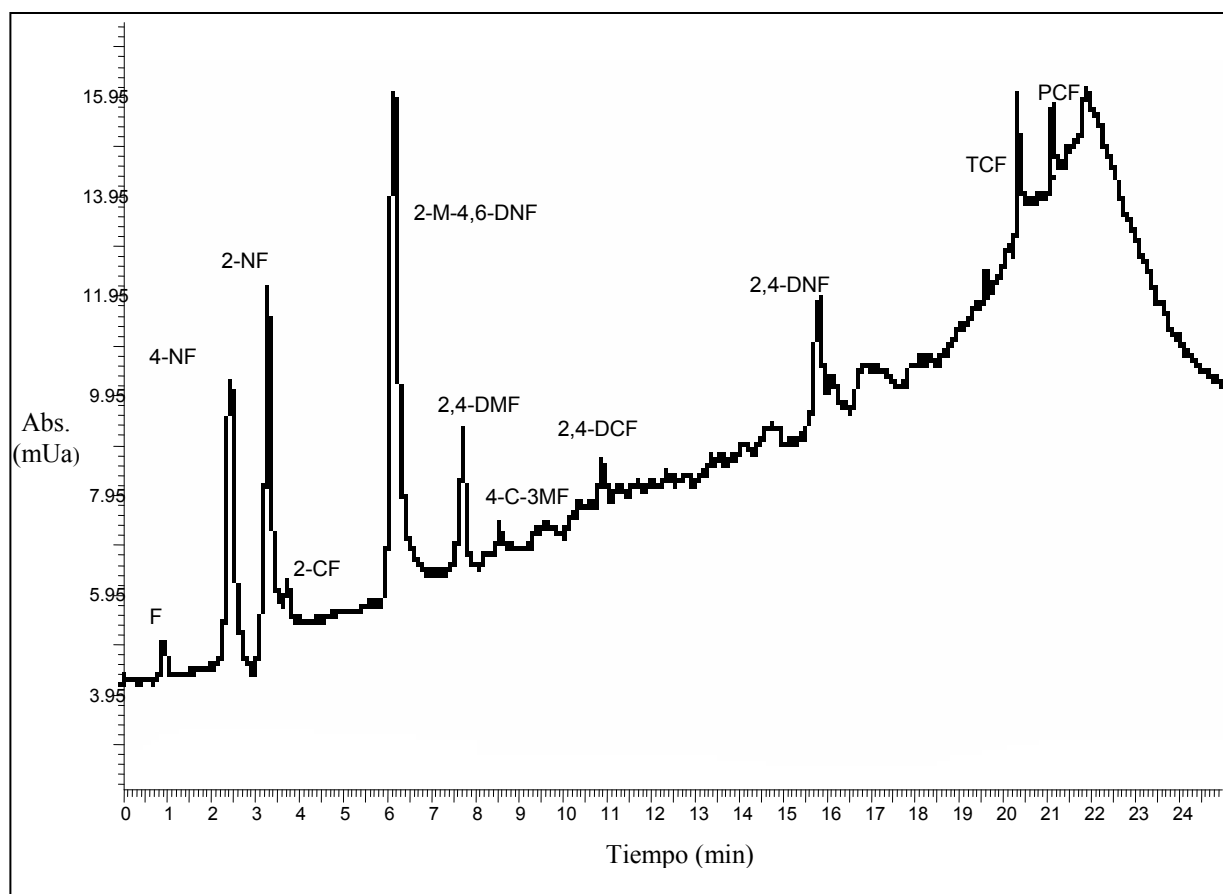


Figura 27. Cromatograma de agua de grifo adicionada con estándares de los 11 compuestos fenólicos

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Separación

La separación es una etapa esencial para la precisión de cualquier método cromatográfico. En el caso del análisis de compuestos fenólicos, la determinación simultánea de ellos es de gran importancia ya que existen muchos compuestos de este tipo, pero sólo algunos están controlados, y además difieren en el grado de toxicidad, por lo que es fundamental establecer adecuadamente las condiciones de separación para posteriormente cuantificar cada analito.

El método desarrollado durante el presente trabajo requirió del empleo de un gradiente de composición de fase móvil, el cual fue fundamental para la separación de los analitos, logrando un tiempo de corrida de 25 minutos. En la figura 2 y en la tabla 3 se observa que el tiempo de retención de los 11 analitos se encuentra en el intervalo de 3.5 a 21.4 minutos.

El tiempo de la separación cromatográfica en este trabajo es considerablemente menor que el reportado por otros autores, como por ejemplo Marengo y colaboradores²⁶, cuyas corridas cromatográficas fueron de 40 minutos y sólo incluían la separación de 8 de los 11 compuestos fenólicos contaminantes prioritarios, o el trabajo reportado por Becerra y colaboradores²³ donde se separan 7 compuestos fenólicos, entre ellos, pentaclorofenol y 2-clorofenol en corridas de 40 minutos.

En trabajos citados en literatura^{23, 24, 25, 26} para la determinación simultánea de compuestos fenólicos se han empleado comúnmente longitudes de onda que van de los 246 a los 285 nm. En nuestro caso, y tomando en cuenta que no contamos con detector de arreglo de diodos, decidimos utilizar la longitud de onda de 280 nm obteniéndose con ello buenos resultados, como se observa en las figuras 2, 25, 26 y 27.

Como técnica de cuantificación se usó la de estándar externo, realizando curvas de calibración para cada compuesto. Para hacer las cuantificaciones se utilizaron las áreas de los picos.

4.2 Validación del sistema cromatográfico

La validación de un método es el proceso de probar que dicho método analítico es aceptable para el propósito que fue desarrollado. Los parámetros de validación que se consideraron para este trabajo son: linealidad, la cual se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta; la precisión, la cual está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de un valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea, exactitud de un método, también conocida como error sistemático, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero. Otros parámetros muy importantes dentro de una validación son los límites de detección y cuantificación, descritos anteriormente.

Se manejaron 8 niveles de concentración para los estándares de calibración (tabla 2). Como se puede apreciar en la tabla 6, la precisión obtenida fue en todos los analitos inferior a 6 de RSD, lo cual cumple con el criterio de aceptación establecido de que fuera menor a 15 de RSD.

En lo que se refiere a linealidad, para los factores de respuesta se obtuvieron valores de RSD de 2.65 a 18.38, los cuales son menores al valor establecido como criterio de aceptación (20%). (tabla 6)

Además el coeficiente de correlación para cada analito es mayor que 0.995, sólo en el caso del 2,4,6-triclorofenol se obtuvo un valor de coeficiente de correlación ligeramente menor (0.992). La prueba t se utilizó como un contraste estadístico para confirmar la linealidad, en nuestro caso el valor de t calculado se comparó con el valor tabulado, t tabulado ($F = 6$ y $P = 0.01$) = 3.71. El valor de t calculado es mayor que el valor de t tabulado para todas las curvas de calibración presentadas en este trabajo (validación del sistema y método cromatográfico), lo cual nos indica que existe una relación lineal entre “x” e “y”, es decir, entre la concentración del analito y el área bajo la curva que nos da el cromatograma.

Los límites de detección obtenidos van de 0.21 $\mu\text{g/mL}$ para el 2-nitrofenol a 2.32 $\mu\text{g/mL}$ para el pentaclorofenol y los límites de cuantificación muestran valores de 0.65 $\mu\text{g/mL}$ para 2-nitrofenol a 7.02 $\mu\text{g/mL}$ para el pentaclorofenol. Las razones por las cuales unos compuestos muestran límites de detección menores a otros son que cada compuesto fenólico tiene una longitud de onda máxima y una absorbtividad molar diferente. Además la longitud de onda utilizada para la determinación es un promedio de las longitudes de onda máximas de los 11 compuestos fenólicos, por lo cual no se pueden obtener los mismos valores de límites de detección y cuantificación para todos los analitos. (tabla 6)

4.3 Evaluación de los métodos de extracción

4.3.1 Extracción en fase sólida

Como se aprecia en la tabla 8, para la extracción en fase sólida se obtuvieron recuperaciones desde 82 % para el 2-NF hasta 99 % para el 2,4-DMF. La precisión que se obtuvo va desde 1.39 de RSD para el 2-NF hasta 3.65 de RSD para el 2,4-DNF.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 8, podemos discutir que no todos los analitos tienen la misma afinidad por el cartucho de extracción, lo cual provoca que no todos los analitos tengan los mismos porcentajes de recuperación.

Los resultados de la recuperación de compuestos fenólicos son más elevados que los reportados por autores como Ali y Aboul Eien²⁵ y Cledera Castro²⁴.

4.3.2 Extracción líquido-líquido

La tabla 7 muestra que los resultados obtenidos mediante extracción líquido-líquido no fueron adecuados, ya que para 5 de los analitos no se obtuvo una señal detectable y para el resto de los analitos, los porcentajes de recuperación van desde 16 % para el TCF hasta 41 % para el fenol. La pobreza de los resultados para LLE se debe muy probablemente a las pérdidas importantes de analito en la manipulación de la muestra como el secado y filtrado.

4.3.3 Selección del método de extracción

En resumen, después de analizar los resultados de las tablas 7 y 8, se puede afirmar que la extracción en fase sólida resultó más eficiente que la extracción líquido-líquido para este trabajo, ya que presentó mayor exactitud y precisión.

4.3.4 Exactitud

Como se había mencionado anteriormente, este parámetro se validó durante la etapa de extracción. La recuperación de los 11 compuestos fenólicos fue satisfactoria ya que presentó recuperaciones de 82% a 98%; además cumple con el criterio de aceptación establecido, ya que las RSD de las recuperaciones fueron inferiores a 20 %.

4.4 Validación del método SPE-HPLC-UV

Para la validación del método SPE-HPLC-UV se usaron 8 intervalos de trabajo, los más bajos fueron de 0.01 a 0.05 $\mu\text{g/mL}$ y los más altos fueron de 0.05 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$. (tabla 9)

Para poder evaluar la linealidad se calcularon los coeficientes de correlación para las curvas de calibración de cada uno de los 11 compuestos fenólicos y para todos se obtuvieron valores mayores a 0.99. También se calculó la RSD de los 8 factores de respuesta y todos resultaron menores de 20%. (tabla 9)

La precisión del método tuvo valores de RSD desde 0.80 para el pentaclorofenol hasta 2.43 para el 4-cloro-3-metilfenol.

Los límites de detección del método desarrollado en este trabajo van de 0.0009 $\mu\text{g/mL}$ (2,4-DMF) a 0.0214 $\mu\text{g/mL}$ (pentaclorofenol).

Con respecto a los límites de cuantificación obtenidos en este trabajo, en la tabla 8 se observa que el intervalo es de 0.0028 $\mu\text{g/mL}$ (2,4-dimetilfenol) a 0.0650 $\mu\text{g/mL}$ (pentaclorofenol). Los resultados obtenidos presentan límites de cuantificación más bajos que los reportados por otros autores²⁶ para compuestos como fenol y 2,4-dimetilfenol. Cabe aclarar que las comparaciones que se han hecho es tomando en cuenta que las validaciones reportadas en literatura no incluyen a todos los compuestos fenólicos contaminantes prioritarios.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método cromatográfico que es aplicable a la determinación de compuestos fenólicos en muestras acuosas.
2. El método desarrollado permite detectar los analitos de interés a niveles de concentración inferiores a los estipulados en regulaciones internacionales (UE, OMS, EPA) y nacionales.
3. El método desarrollado resultó ser un método con una precisión y exactitud aceptables, ya que los resultados obtenidos durante la validación quedan dentro de los criterios establecidos.
4. El pentaclorofenol tiene un límite máximo permisible de 0.009 ppm según la OMS. Se puede utilizar un factor de concentración de 1000 para determinarlo usando la metodología propuesta en este trabajo.
5. El método propuesto en este trabajo presenta un tiempo de separación cromatográfica menor que los propuestos por autores como Marengo, Becerra y Cledera-Castro.

TRABAJO FUTURO

Los resultados obtenidos en esta tesis serán de utilidad para el desarrollo de la tesis de maestría titulada “Degradación de fenol, 2-clorofenol y 2,4,6-triclorofenol en muestras de agua residual por fotocátalisis heterogénea”, que actualmente se desarrolla en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

BIBLIOGRAFÍA

1. US Environmental Protection Agency, Method 604. Phenols. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. (1994)
2. Schifter, I.; “Descomposición de fenol en medio acuoso con peróxido de hidrógeno catalizada por cenizas provenientes de la combustión de carbón mineral”, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco – Instituto Mexicano del Petróleo. (2004)
3. Agency Toxic Substances and Disease Registry, “Resumen de salud pública de fenol”. (2002) www.atsdr.cdc.gov Fecha de acceso 21/07/2007
4. Lobbes, J.; Fitznar H.; Kattner G.; “High performance liquid chromatography of lignin-derived phenols in environmental samples with diode array detection”, *Anal Chem.*, Vol. 71, pp.: 3008-3012, (1999)
5. Natercia, S.; Cardoso V.; Benoliel M.; “Experimental and statistical validation of SPME-GC–MS analysis of phenol and chlorophenols in raw and treated water”, *Chemosphere*, Vol. 68, pp.: 501-510, (2007)
6. Campillo, N.; Peñalver R.; Hernández-Córdoba M.; “A sensitive solid-phase microextraction/gas chromatography-based procedure for determining pentachlorophenol in food”, *Food Additives & Contaminants*, Vol. 24, pp.: 777-783, (2007)
7. Drinking Water Directive. Commission of the European Communities, Brussels (1980)
8. Morrison, R.T.; Boyd, R.N.; Química Orgánica. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. Capítulo 28: “Fenoles”, pp.: 980-999 (1998)

9. Carey, F.A.; Química Orgánica. Editorial Mc Graw Hill. Capítulo 24: “Fenoles”, pp.: 993-1015 (2003)
10. Wiley, J. and Sons, The Chemistry of Phenols. An Interscience Publication. Capítulo 10: “Synthetic uses of phenols”, pp.: 661-673 (2003)
11. Handbook of Chemistry and Physics. 58th edition. Cleveland, Ohio. (2000)
12. Organización Mundial de la Salud (OMS) www.who.int Fecha de acceso 15/08/2007
13. NOM-127-SSA1-1994, “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”. (1994)
14. Modificación a la NOM-127-SSA1-1994, Diario Oficial de la Federación. (2000).
15. Gryniewicz, M.; Polkowska, Z.; Kot-Wasik, A.; Namiesnik, J.; “Determination of phenols in Runoff”, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 11, pp.: 85-89, (2002)
16. NMX-AA-050-SCFI-2001. “Análisis de agua – Determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas”. México. (2001)
17. Galeano-Díaz, T.; Guiberteau-Cabanillas, A.; Mora-Díez, N.; Parrilla Vázquez, P.; Salinas-López, F.; “Rapid and sensitive determination of 4-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, 4,6-dinitro-o-cresol, parathion-methyl, fenitrothion, and parathion-ethyl by liquid chromatography with electrochemical detection”, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, pp.: 4508-4513, (2000)
18. Gyorik, M.; Herpai, Z.; Szeczenyi, I.; Varga, L.; Szigeti, J.; “Rapid and sensitive determination of phenol in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection”, *J. Agric. Food Chem.*, Vol 51, pp.: 5222-5225, (2003)

19. Bennet, B.; Bowler, B.; Larter, S.; "Determination of C₀-C₃ alkylphenols in crude oils and waters", *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp.: 3697-3702, (1996)
20. Mateos, M.; Espartero, J.; Trujillo, M.; Ríos, J.; León-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A.; "Determination of phenols, flavones, and lignans in virgen olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 49, pp.: 2185-2192, (2001)
21. Ziaková, A.; Brandfsteterova, E.; "Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some *Lamiceae* family plants", *Journal of Liquid Chromatographic & Related Techonologies*, Vol. 26, pp.: 443-453, (2003)
22. Muna, G.; Tasheva, N.; Swain G.; "Electro-oxidation and amperometric detection of chlorinated phenols at boron-doped diamond electrodes: A comparison of microcrystalline and nanocrystalline thin films", *Environ Sci Technol.*, Vol. 38, pp.: 3674-3682. (2004)
23. Becerra, Q.; Comide, L.; Foresti, E.; Zamarioli, M.; "Development of HPLC method for the analysis of chlorophenols in samples from anaerobic reactors for wastewater treatment", *J. Liq. Chrom & Rel. Technol.*, Vol. 23, pp.: 1089-1097, (2000)
24. Cledera-Castro, M.; Santos-Montes, A.; Izquierdo-Hornillos, R.; "Method development and validation for phenol and nitrophenols in tap water by HPLC using a monolithic column", *LC-GC Europe*, pp.: 424-431, (2006)
25. Ali, I.; Aboul-Enein, H.; "Fast screening of phenol and its derivatives in wastewater by HPLC by using monolythic silica column and solid-phase extraction", *Analytical Letters*, Vol. 37, pp.: 2351-2361, (2004)

26. Marengo, E.; Gennaro, M.; Giannotti, V.; Angelino, S.; “A test of robustness in IIR-RP-HPLC separation of nine priority pollutant phenols”, *J. Liq. Chrom.*, Vol. 24, pp.: 341-353, (2001)
27. Zhao, R.; Cheng, C.; Yuan, J.; “Sensitive measurement of ultratrace phenols in natural water by purge-and-trap with in situ acetylation coupled with gas chromatography-mass spectrometry”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 387, pp.: 687-694, (2007)
28. Ye, C.; Zhou, Q.; Wang, X.; “Determination of phenols in environmental water samples by ionic liquid-based headspace liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid-chromatography”, *Journal of Separation Science*, Vol. 30, pp.: 42-47, (2007)
29. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (2001)
30. US Environmental Protection Agency, Method 8270 for multicomponent analyt determination. (2000)
31. Miller, J.N.; Miller, J.C.; Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Cuarta edición, Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. (2002)
32. Touratier, S.; Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos. Colección de Textos Politécnicos. Serie: Ciencias de la Salud, Editorial Limusa S.A. de C.V., Grupo Noriega Editores. Capítulo 5: “Validación de un método analítico aplicado al análisis cuantitativo de medicamentos”. (1998)
33. Swartz, M.; Analytical method development and validation, Décima reimpresión, Editado por Waters Corporation. (1997)

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Manuel Alejandro Alemán García

**Candidato para el grado de Maestro en Ciencias
con Orientación en Química Analítica Ambiental**

**Tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN
DE 11 COMPUESTOS FENÓLICOS EN MUESTRAS DE AGUA**

Área de Estudio: Química Analítica Ambiental

Biografía:

Datos Personales: Nacido el 29 de enero de 1985 en San Nicolás de los Garza, Nuevo León; hijo del Sr. Manuel Alemán Flores y la Sra. María Guadalupe García Lara

Escolaridad:

Obtención del Título de Licenciado en Química Industrial, en la Facultad de Ciencias Químicas-UANL (2006)