

7.01612

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314061457

**PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE FENOLES
CONTAMINANTES PRIORITARIOS Y DETERMINACIÓN POR
ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE,
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA Y
CROMATOGRFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

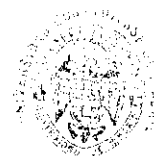
TESIS DOCTORAL

MARIA EUGENIA SILVA VARGAS

DIRECTORES: Dra. MARIA EUGENIA DE LEÓN GONZÁLEZ

Dr. LUIS VICENTE PÉREZ ARRIBAS

MADRID – 2000



11/11/2000



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 43 31
Fax. 91 394 43 29

MARIA EUGENIA DE LEÓN GONZÁLEZ, PROFESORA TITULAR Y LUIS VICENTE PÉREZ ARRIBAS, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado **“PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE FENOLES CONTAMINANTES PRIORITARIOS Y DETERMINACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE, CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA Y CROMATOGRFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS”** ha sido realizado en este Departamento y en el Departamento de Química Analítica y Físico-Química de la Universidade Federal de Ceará por Maria Eugenia Silva Vargas, bajo nuestra dirección constituyendo la TESIS DOCTORAL de su autora.

Dra. Maria Eugenia de León González

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

MADRID, 8 de marzo de 2000

DEDICATORIA
(póstuma)

A Francisca Águida Costa

PENSAMIENTO

*“La Crisis se Vence con Trabajo
Determinación y Creatividad”*

Dr. Antônio de Albuquerque Sousa Filho
Magnífico Rector

Universidade Federal de Ceará – Brasil
Gestión: 1991 – 1995

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Eugenia de León González, directora de esta Tesis, por su permanente asesoramiento, competencia y apoyo en la realización de este trabajo y por su sincera amistad.

Al Dr. Luis Vicente Pérez Arribas, codirector de esta Tesis, por su ayuda constante, competencia y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis María Polo Díez, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por haber puesto a mi disposición los medios necesarios para la realización de esta Tesis y por su apoyo constante.

Agradezco a la Universidade Federal de Ceará – Brasil la oportunidad que me ha ofrecido de obtener este Título, principalmente a todos los profesores del Departamento de Química Analítica y Físico-Química, en particular a Ms. María de Fátima Gomes Lopes y a Ms. Francisco Antonio Guimarães.

Agradezco al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq – Brasilia / Brasil), el apoyo financiero para la realización de esta Tesis.

A todos los profesores de los Cursos de Doctorado en Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, por los conocimientos adquiridos.

Al Dr. Fernando Navarro Villoslada, por su colaboración constante en el desarrollo de este trabajo.

A las Dras. Sara Rubio Barroso, María Jesús Santos Delgado y María Concepción Pérez Conde y a los Drs. Víctor Rosas Murillo y Nour Kayali Sayadi por su amistad y bondad.

Deseo agradecer a Gema su gran colaboración, como también a Almudena, Julián, Rosa, Emilia, Olga, Francis, Sergio, Toñi, Cristina y Prado, compañeros de laboratorio, por su amistad y sus constantes estímulos.

Mi agradecimiento también a los funcionarios del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid y a los del Departamento de

Química Analítica y Físico-Química de la Universidade Federal de Ceará, que de forma directa o indirecta, han contribuido a esta Tesis.

Agradezco a mi madre, hermanos, cuñados, sobrinos y en especial a mi esposo Mario, mis hijos Johann y Pablo, por entender mi ausencia durante la realización de esta Tesis.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

4-AAP	= 4-aminoantipirina
AED	= Detector de Emisión Atómica (Atomic Emission Detector)
AFT	= aminofeniltrimetoxisilano
CE	=Comunidad Europea
CF	= clorofenoles
2-CF	= 2-clorofenol
4-C-3-MF	= 4-cloro-3-metilfenol
CPG	= Vidrio de Poro Controlado (Controlled Pore Glass)
4,4'-DCB	= 4,4'-diclorobifenilo
2,4-DCF	= 2,4-diclorofenol
2,4-DMF	= 2,4-dimetilfenol
2,4-DNF	= 2,4-dinitrofenol
2,4-DN-6-SBF	= 2,4-dinitro-6-secbutilfenol
4,6-DN-2-MF	= 4,6-dinitro-2-metilfenol
ECD	= Detector de Captura Electrónica (Electron Capture Detector)
F	= Fenol
FCP	= Fenoles Contaminantes Prioritarios
FIA	= Análisis de Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis)
FID	= Detector de Ionización de Llama (Flame Ionization Detector)
FTIR	= Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GC	= Cromatografía de Gases (Gas Chromatography)
HPLC	= Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography)

L.C.	= Límite de Cuantificación
L.D.	= Límite de Detección
MAC	= Concentración Máxima Admisible (Maximum Admissible Concentration)
m/z	= Relación masa/carga de un ion (mass/charge)
MS	= Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry)
NF	= nitrofenoles
2-NF	= 2-nitrofenol
4-NF	= 4-nitrofenol
NPD	= Detector Nitrógeno-Fósforo (Nitrogen-Phosphorus Detector)
OAD	= Matriz de Diseño Ortogonal (Orthogonal Array Design)
PCF	= pentaclorofenol
SFE	= Extracción con Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction)
SIM	= Detección de Iones Seleccionados (Single Ion Monitoring)
TBA	= tetrabutilamonio
2,4,6-TBF	= 2,4,6-tribromofenol
2,4,6-TCF	= 2,4,6-triclorofenol
2,4,6-TMA	= 2,4,6-trimetilanilina
USEPA	= Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (United State Environmental Protection Agency)
UV-VIS	= Ultravioleta Visible

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. GENERALIDADES SOBRE FENOLES	5
2.1.1. Características generales y estructuras	5
2.1.2. Origen y propiedades	7
2.1.3. Reactividad y estabilidad	11
2.1.4. Toxicidad	12
2.1.5. Aplicaciones	14
2.2. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS MÁS RELEVANTES PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES	16
2.2.1. Métodos espectrofotométricos en ultravioleta-visible (UV-VIS)	16
2.2.2. Métodos cromatográficos	21
2.2.2.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21
2.2.2.2. Cromatografía de gases (GC)	25
2.2.2.3. Otros métodos cromatográficos	28
2.2.3. Métodos automáticos	29
2.2.4. Otros métodos analíticos	31
2.3. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE FENOLES	34
2.3.1. Introducción	34
2.3.2. Métodos de extracción en fase sólida	34
2.3.3. Métodos de extracción líquido-líquido	39
2.3.4. Otros métodos de extracción y preconcentración	41

2.4. GENERALIDADES SOBRE LA INMOVILIZACIÓN DE REACTIVOS	42
2.4.1. Introducción	42
2.4.2. Métodos de inmovilización de reactivos.....	43
2.4.2.1. Métodos físicos	43
2.4.2.2. Métodos químicos.....	47
2.5. GENERALIDADES SOBRE LA 8-HIDROXIQUINOLINA (OXINA).....	52
2.5.1. Introducción	52
2.5.2. Propiedades y reactividad.....	52
2.5.3. Aplicaciones.....	55
3. FINALIDAD Y PLANTEAMIENTO.....	57
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	60
4.1. APARATOS Y MATERIAL	61
4.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	62
4.3. PROCEDIMIENTOS.....	65
4.3.1. Procedimiento de inmovilización de la 8-hidroxiquinolina (oxina) en vidrio de poro controlado (CPG).....	65
4.3.2. Determinación de la eficacia de la inmovilización oxina-CPG por formación de oxinato de aluminio con detección espectrofotométrica	66
4.3.3. Determinación de fenoles con detección espectrofotométrica.....	67
4.3.4. Determinación de la retención y elución de los fenoles a diferentes pHs y caudales con detección espectrofotométrica	68

4.3.5. Determinación de clorofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	69
4.3.6. Preconcentración selectiva de clorofenoles y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	70
4.3.7. Determinación de nitrofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	70
4.3.8. Preconcentración selectiva de nitrofenoles y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	71
4.3.8.1. Procedimiento para el 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol	71
4.3.8.2. Procedimiento para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol	71
4.3.9. Determinación de clorofenoles por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).....	72
4.3.10. Preconcentración selectiva de clorofenoles y determinación por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)	72
4.3.11. Determinación de pentaclorofenol en madera de pino (serrín)	73
4.3.12. Determinación de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (dinoseb) en zumo de limón	73
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
5.1. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE LA INMOVILIZACIÓN OXINA-CPG POR FORMACIÓN DE OXINATO DE ALUMINIO CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	75
5.1.1. Calibrado de la oxina	75
5.1.2. Eficacia de la inmovilización de la oxina-CPG	77
5.1.3. Estabilidad de la oxina-CPG en ausencia de fenoles.....	78

5.2. ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DIFERENTES FENOLES CLORADOS, NITRADOS Y METILADOS	79
5.2.1. Calibrados de los fenoles en medio acuoso a pH 1.0.....	79
5.2.2. Calibrados de los fenoles en acetonitrilo.....	81
5.3. ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA RETENCIÓN Y ELUCIÓN DE FENOLES CLORADOS, NITRADOS Y METILADOS.....	82
5.4. OPTIMIZACIÓN DE LA RETENCIÓN Y ELUCIÓN DE LOS FENOLES	93
5.4.1. Influencia del pH en la retención y elución de los fenoles.....	93
5.4.2. Influencia de la naturaleza de los fenoles en la retención.....	94
5.4.3. Influencia de la naturaleza de disolventes orgánicos en la retención del pentaclorofenol	95
5.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PENTACLOROFENOL.....	98
5.5.1. Estabilidad del pentaclorofenol retenido en la columna oxina-CPG.....	98
5.5.2. Estabilidad de la columna oxina-CPG con el paso de muestras.....	98
5.6. ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD DE LA PRECONCENTRACIÓN DE PENTACLOROFENOL	99
5.6.1. Reproducibilidad de la retención del pentaclorofenol en una misma columna.....	99
5.6.2. Reproducibilidad de la retención del pentaclorofenol en distintas columnas	100
5.7. ESTUDIO CONJUNTO DE CLOROFENOLES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC).....	102
5.7.1. Optimización de las condiciones cromatográficas	102
5.7.1.1. Elección de la longitud de onda	102

5.7.1.2. Optimización del pH.....	103
5.7.1.3. Elección de la fase móvil	105
5.7.2. Características analíticas de la determinación de clorofenoles por HPLC	107
5.7.2.1. Calibrado de los clorofenoles.....	107
5.7.2.2. Límite de detección y cuantificación	109
5.7.2.3. Reproducibilidad	110
5.8. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE CLOROFENOLES Y DETERMINACIÓN POR HPLC.....	112
5.8.1. Estudio de la preconcentración selectiva de clorofenoles en columna oxina – CPG y análisis por HPLC	112
5.8.2. Evaluación del volumen de ruptura.....	113
5.8.3. Estudio de la influencia de la concentración	115
5.8.4. Estudio de la elución del pentaclorofenol en acetonitrilo.....	118
5.9. ESTUDIO CONJUNTO DE NITROFENOLES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)	121
5.9.1. Optimización de las condiciones cromatográficas	121
5.9.1.1. Elección de la longitud de onda	121
5.9.1.2. Optimización del pH.....	123
5.9.1.3. Elección de la fase móvil	125
5.9.2. Características analíticas de la determinación de los nitrofenoles por HPLC	127
5.9.2.1. Calibrado de los nitrofenoles.....	127
5.9.2.2. Límite de detección y cuantificación	128
5.9.2.3. Reproducibilidad	129

5.10. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE NITROFENOLES Y DETERMINACIÓN POR HPLC	131
5.10.1. Estudio previo de preconcentración selectiva de nitrofenoles en columna oxina – CPG	131
5.10.1.1. Estudio del acondicionamiento de la columna oxina – CPG para la preconcentración del 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol	136
5.10.1.2. Estudio del acondicionamiento de la columna oxina – CPG para la preconcentración del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.....	137
5.10.2. Evaluación del volumen de ruptura.....	138
5.10.3. Estudio de la influencia de la concentración	140
5.11. ESTUDIO CONJUNTO DE CLOROFENOLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).....	143
5.11.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	143
5.11.1.1. Elección del patrón interno.....	143
5.11.1.2. Elección de las condiciones cromatográficas.....	144
5.11.1.3. Elección de las relaciones masa/carga (m/z) para el modo de detección de iones seleccionados (SIM).....	149
5.11.2. Características analíticas de la determinación de clorofenoles por GC/MS.....	149
5.11.2.1. Calibrado de los clorofenoles.....	149
5.11.2.2. Intervalo de linealidad	155
5.11.2.3. Límite de detección y cuantificación	156
5.12. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE CLOROFENOLES Y DETERMINACIÓN POR GC/MS	158
5.12.1. Estudio de la preconcentración selectiva de clorofenoles y determinación por GC/MS	158

5.12.2. Evaluación del volumen de ruptura	159
5.12.3. Reproducibilidad	161
5.13. DETERMINACIÓN DE FENOLES EN DIVERSAS MUESTRAS.....	163
5.13.1. Determinación de pentaclorofenol en madera de pino (serrín)	163
5.13.1.1. Tratamiento de la muestra	163
5.13.1.2. Estudio de recuperación	163
5.13.2. Determinación de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (dinoseb) en zumo de limón	166
5.13.2.1. Tratamiento del zumo de limón.....	167
5.13.2.2. Estudio de recuperación del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol	167
6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFÍA	179

1. INTRODUCCIÓN

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 su persistencia. La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera once compuestos fenólicos como contaminantes prioritarios: pentaclorofenol (PCF), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF), 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), 2-clorofenol (2-CF), fenol (F), 4,6-dinitro-2-metilfenol (4,6-DN-2-MF), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF), 2-nitrofenol (2-NF), 4-nitrofenol (4-NF), 4-cloro-3-metilfenol (4-C-3-MF) y 2,4-dimetilfenol (2,4-DMF).

La presencia de estos compuestos en el medio ambiente es consecuencia, en gran parte, de procesos industriales y agrícolas. Por otro lado, la importancia que tienen estos fenoles para la salud humana, así como su posible presencia en aguas, suelos y alimentos, hace que las cantidades máximas de fenoles estén reguladas por la legislación de cada país. La Comunidad Europea (CE) establece, como concentración máxima admisible (MAC) de fenoles en agua de consumo humano, 0.1 $\mu\text{g/L}$ en contenido individual y 0.5 $\mu\text{g/L}$ en contenido total, y en frutas y verduras, las cantidades individuales son del orden de mg/kg.

Los clorofenoles son tóxicos a concentraciones por debajo de $\mu\text{g/L}$ y también son persistentes. El pentaclorofenol, además, produce modificaciones en los cromosomas, acción que está relacionada con la oncogenia. Los nitrofenoles pueden producir alteraciones del metabolismo, causando un agotamiento completo de las proteínas. La intoxicación produce alteraciones en el esqueleto, en el riñón y en el hígado.

Para la detección de estos compuestos es necesaria la utilización de técnicas que ofrezcan alta sensibilidad y selectividad. Las más utilizadas son la espectrofotometría, tras preconcentración selectiva con altos factores de preconcentración, y la cromatografía acoplada a un detector muy selectivo, como el espectrómetro de masas.

Dados los límites máximos de concentración establecidos por la ley y la falta de selectividad de algunas de las técnicas analíticas utilizadas para su determinación, el desarrollo de etapas previas de preconcentración más selectivas y con altos factores de preconcentración permitiría la determinación de cloro- y nitrofenoles con técnicas menos selectivas, como la espectrofotometría UV-VIS.

El presente trabajo se centra en el desarrollo de un método de preconcentración basado en la retención de cloro- y nitrofenoles en una columna de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado, y su elución con disolventes compatibles con la determinación de dichos fenoles mediante cromatografía líquida con detección UV-VIS o cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se estudiarán las condiciones óptimas de preconcentración y se buscarán condiciones de máxima selectividad recurriendo al uso de la modificación de la capacidad de retención de la oxina inmovilizada con ayuda de disoluciones de hierro (III).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES SOBRE FENOLES

2.1.1. Características generales y estructuras

Los fenoles son compuestos aromáticos que contienen grupos hidroxilo ligados directamente al anillo aromático y se clasifican en monohidroxílicos, dihidroxílicos, trihidroxílicos, etc. según el número de grupos hidroxilo.

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. Por ejemplo el fenol mismo es un desinfectante general que se encuentra en el alquitrán de hulla.

Por otra parte, los fenoles, como los alcoholes, contienen el grupo -OH, teniendo estas familias algunas características semejantes. Sin embargo, tanto en la preparación, como en las propiedades estos compuestos son bastante diferentes, y es necesario clasificarlos en distintas familias.

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 (1).

La estructura y abreviaturas de los once fenoles contaminantes prioritarios se presenta en la figura 1 (2).

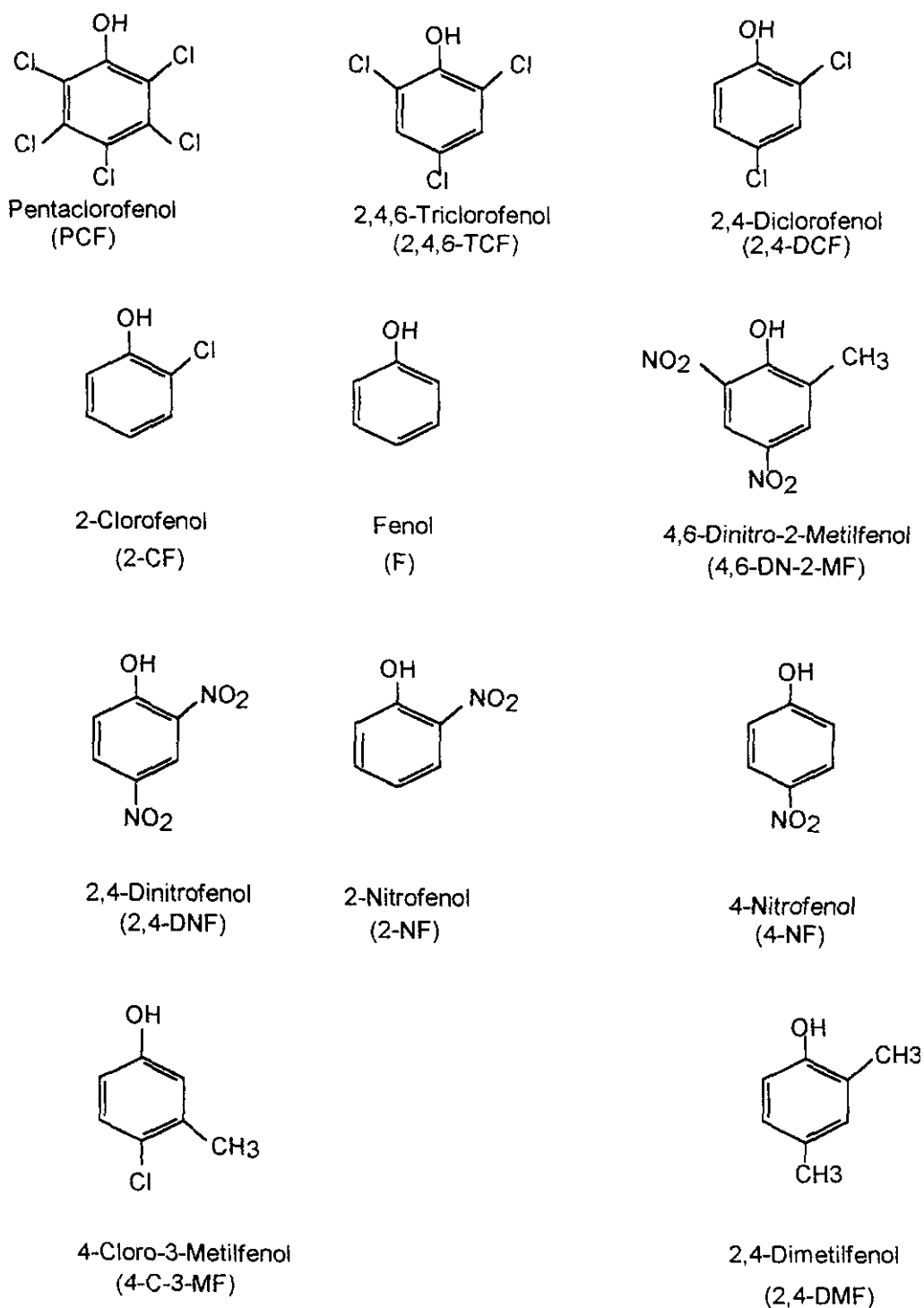


Figura 1. Estructura y abreviaturas de los fenoles contaminantes prioritarios

2.1.2. Origen y propiedades

La mayoría de los derivados fenólicos se obtienen a partir del fenol, el cual a su vez se sintetiza a partir del benceno, considerándose el fenol uno de los principales compuestos aromáticos sintéticos. A partir del alquitrán de hulla se obtienen fenol y metilfenoles, sin embargo, las reacciones de síntesis son la principal fuente de producción.

Los métodos tradicionales de síntesis consisten en la fusión del benzenosulfonato de sodio con álcali o en la hidrólisis del clorobenceno, conocido como proceso Dow. Estos métodos están siendo sustituidos por uno más moderno, cuyo procedimiento es el siguiente: el benceno se alquila con propileno para dar cumeno (isopropilbenceno), siendo el mismo oxidado con aire a hidroperóxido de cumeno; a su vez, éste se transforma en fenol y acetona con ácido acuoso. La síntesis del fenol se presenta en la figura 2.

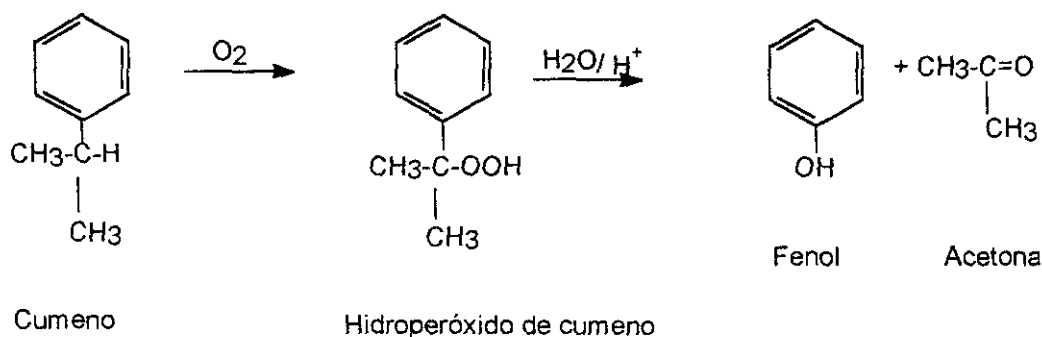


Figura 2. Síntesis del fenol

Ciertos fenoles y sus éteres también pueden encontrarse en la naturaleza y pueden aislarse de los aceites esenciales de varias plantas. Algunos de estos fenoles como el eugenol, el isoeugenol, el anetol, la vainillina y el timol son

responsables del olor del clavo, nuez moscada, anís, vainilla, tomillo y de la menta (3).

Una cantidad importante de clorofenoles se obtiene a partir de los procesos de cloración y se producen en la purificación de aguas residuales y en el blanqueo del papel.

El cloro también se utiliza para evitar el crecimiento de algas y otros organismos en las aguas de refrigeración de las centrales hidroeléctricas y aunque los fenoles se encuentran en bajas concentraciones, tienen importancia dado el gran volumen de agua tratada lo que conlleva una liberación de grandes cantidades de clorofenoles en el medio ambiente (4,5).

Los fenoles son compuestos con carácter ligeramente ácido, propiedad esta que los distingue de los alcoholes. La mayoría de los fenoles son más ácidos que el agua, lo que permite que hidróxidos alcalinos en disolución acuosa reaccionen con ellos formando sales o iones fenóxidos, mientras que los ácidos minerales los transforman de nuevo en fenoles. Los iones fenóxidos son más estables que los propios fenoles debido al efecto neto de la resonancia del anillo aromático.

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 o grupo nitro, aumentan la acidez, mientras que los sustituyentes que los liberan, como los grupos metilo, la disminuyen (3).

En la tabla 1 se presentan las constantes de acidez de los fenoles contaminantes prioritarios (6).

Tabla 1. Constantes de acidez de los fenoles contaminantes prioritarios.

Compuesto	pKa
Pentaclorofenol	5.25
2,4,6-Triclorofenol	6.00
2,4-Diclorofenol	7.95
2-Clorofenol	8.48
Fenol	9.99
4,6-Dinitro-2-metilfenol	4.31
2,4-Dinitro-6-secbutilfenol	4.40
2,4-Dinitrofenol	3.94
2-Nitrofenol	7.23
4-Nitrofenol	7.08
4-Cloro-3-metilfenol	9.55
2,4-Dimetilfenol	10.58

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 y es fácil encontrarlos coloreados, por esta razón tienen que ser cuidadosamente purificados.

La oxidación de los fenoles depende de la exposición a la luz y al aire, como también de la presencia o ausencia 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 las responsables de la coloración de estos compuestos (3).

La mayoría de los fenoles son poco solubles en agua y la solubilidad disminuye cuando aumenta la fuerza iónica del medio.

La solubilidad de fenol en agua es de 6.6%, probablemente por la formación de puentes de hidrógeno. La mayoría de los otros fenoles son esencialmente insolubles.

En la tabla 2 se presentan las propiedades físicas de los fenoles contaminantes prioritarios (7).

Tabla 2. Propiedades físicas de los fenoles contaminantes prioritarios.

Compuesto	Peso Molecular	Punto de Fusión, °C	Punto de Ebullición, °C	Densidad Relativa	Solubilidad en agua, %(p/p)
PCF	266.34	191.0	310.0	1.978(22°C)	20-25 mg/L
2,4,6-TCF	197.45	69.5	246.0	1.490(35°C)	P.S.
2,4-DCF	163.00	45.0	210.0	-	P.S.
2-CF	128.56	9.0	174.9	1.2634(20°C)	0.1
F	94.11	43.0	181.7	1.0722(20°C)	6.6
4,6-DN-2-MF	198.13	83.0 - 85.0	-	-	128 mg/L
2,4-DNF	184.11	115.0 - 116.0	8.0	1.6830(24°C)	0.033
2-NF	139.11	45.3 - 45.7	216.0	1.2942(40°C)	0.108
4-NF	139.11	114.9 - 115.6	279.0(S,D)	1.4790(20°C)	1.16
4-C-3-MF	142.59	66.0 - 68.0	235.0	-	P.S.
2,4-DMF	122.17	27.0 - 28.0	210.0	1.5420(14°C)	P.S.

P.S. = poco soluble

S = sublima

D = descompone

2.1.3. Reactividad y estabilidad

A parte 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 (3).

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. Figuras 3 y 4.

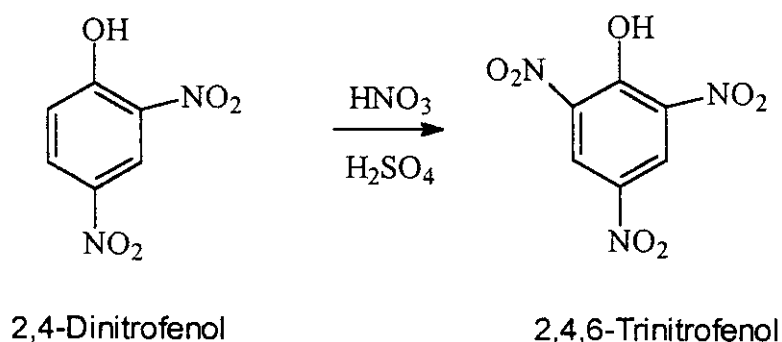


Figura 3. Reacción de 2,4-dinitrofenol con ácido nítrico concentrado

Entre los efectos de los fenoles sobre los seres vivos hay que destacar las modificaciones que produce en los cromosomas; esta acción está relacionada con la oncogenia. En general se ha encontrado una baja toxicidad oral de los clorofenoles en organismos animales (13), con excepción del pentaclorofenol cuya toxicidad y oncogenicidad se deben a la frecuente contaminación con dioxina (14) y fenoxifenoles (15). Pero cuando se purifica cuidadosamente, solamente hay un pequeño efecto mutagénico en células de mamífero (16).

Banerjee y colaboradores comprueban que el aumento de la toxicidad de los clorofenoles, esta con relación al número de sustituyentes de cloro, se relaciona con la difícil biodegradación de estos compuestos, atribuyendo a sus propiedades lipofílicas la difícil degradación de los mismos (17,18).

Schultz y Rigglin, encuentran una gran correlación entre la toxicidad de los alquilfenoles y fenoles halogenados, con el coeficiente de partición n-octanol/agua, concluyendo que los fenoles con sustituyentes dadores de electrones, como los grupos alquilo, son menos tóxicos que aquellos con sustituyentes aceptores de electrones, como los halógenos (19).

Con relación a los nitrofenoles la toxicidad decrece al aumentar el grado de nitrosustitución. Los nitrofenoles y metilnitrofenoles, contaminantes secundarios en el aire se encuentran en concentraciones de 1 – 100 nmol/L en el agua de lluvia. Se observaron concentraciones más altas para el 4,6-dinitro-2-metilfenol, 4-nitro-3-metilfenol y 4-nitrofenol. En suelos, las concentraciones disminuyen debido a los procesos de absorción y degradación por microorganismos, predominando las formas orto (o-) de este tipo de contaminantes.

El transporte de los pesticidas fenólicos ocurre en fase de vapor y como partículas en suspensión; este mecanismo es el responsable de la contaminación por estas sustancias de aguas superficiales y subterráneas (20).

El herbicida 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, conocido como dinoseb, produce alteraciones en el esqueleto y afecta al riñón (21).

Es importante señalar el efecto para la salud humana de la presencia de clorofenoles en agua, pues estos compuestos se producen por acción del cloro,

sobre la materia orgánica presente en disolución, durante los procesos de cloración.

Muchos fenoles son objeto de legislación tanto en el tipo, como en la cantidad. La directiva 80/778/EEC de la Comunidad Europea (CE) especifica 0.5 µg/L de fenoles totales, como Concentración Máxima Admisible (MAC) en agua para consumo humano, excluyendo aquellos fenoles que no reaccionan con el cloro (Cl₂) ó 0.1 µg/L para los compuestos individuales (22).

2.1.5. Aplicaciones

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.

Los principales usos de los fenoles y derivados son (23, 24):

- Conservantes 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 para la fabricación de resinas de fenol-formaldehído para revestimientos y como agentes de unión de productos laminados. Los metilfenoles se utilizan para la fabricación del fosfato tricrisélico, 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 de copulación entre un fenol y otro compuesto aromático.
- Detergentes: se usan los fenoles en la fabricación de detergentes por que ellos mismos tienen actividad superficial.

- Desinfectantes: la actividad desinfectante de un fenol 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 derivada del fenol. El ácido acetil salicílico deriva del fenol por la síntesis de Kolbe para fabricación de la aspirina. El salicilato de metilo y otros ésteres del ácido salicílico se usan como saborizantes y perfumes.
- Fotografía: algunos aminofenoles son reveladores fotográficos, el 2,4-dinitrofenol se usa como intermedio del nitroaminofenol y del diaminofenol.
- Explosivos: algunos fenoles tienen propiedades detonantes, como el 2,4,6-trinitrofenol, conocido como ácido pícrico y el diazonitrofenol.
- Tratamiento de caucho: los metilfenoles butilados son estabilizadores y antioxidantes útiles del caucho.
- Taninos sintéticos, lubricantes y numerosas síntesis orgánicas. El 2,4-diclorofenol se usa como intermedio en la producción del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por reacción de su sal de sodio con la del ácido cloroacético.
- El 2-nitrofenol se usa en la preparación de 2-aminofenol y del 2-nitroanisol y de ciertos tintes.

2.2. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS MÁS RELEVANTES PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

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

2.2.1. 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.

Las reacciones más corrientes son las de copulación que generan colorantes azoicos intensamente coloreados y que son fácilmente analizables en el espectro visible. 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 diazotado empleado, naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo aromático.

Mohler y Jacob hacen un estudio de cinco métodos espectrofotométricos para la determinación de bajas concentraciones de fenoles en aguas residuales y potables. Los cinco métodos utilizados son: Gibbs, nitrosfenol, 4-aminoantipirina (4-AAP), ultravioleta e infrarrojo. El método de la 4-AAP es el más rápido, preciso y exacto. Sin embargo, estos métodos, excepto los que utilizan la absorción que presentan estos compuestos en el zona de ultravioleta e infrarrojo, son insensibles a aquellos fenoles sustituidos en la posición para- del anillo aromático por tener desactivada la posición tanto para las reacciones de copulación, como para las de condensación (25).

Los métodos espectrofotométricos en la zona del ultravioleta se basan en el desplazamiento batocrómico que tiene la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorción de los fenoles en disolución alcalina, lo que permite la eliminación de muchas interferencias (26). Se han realizado determinaciones al nivel de mg/L con posibilidad de determinar concentraciones al nivel de $\mu\text{g/L}$ (27, 28).

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 absorptividad molar de estos compuestos.

La determinación de pentaclorofenol en muestras de madera y cuero en el intervalo de concentración de 1-40 mg/L ha sido llevada a cabo con recuperaciones superiores al 98%, mediante extracción sólido-líquido (29).

Bosch, Font y Mañes hacen la determinación de fenoles en aguas natural y residual, por formación de compuestos halogenados que presentan mayor absorptividad molar y esto ha permitido detectar cantidades del orden de $\mu\text{g/L}$ (30).

Norwitz, Bardsley y Keliher estudiaron la influencia de ion sulfito (SO_3^{2-}) y cloruro de sodio (NaCl) en las reacciones con 4-aminoantipirina (31, 32).

Koch y colaboradores llevan a cabo la determinación de fenoles usando el complejo de hierro-EDTA (Fe-EDTA) (33).

León González y colaboradores, llevan a cabo la determinación simultánea del 2-nitrofenol y 4-nitrofenol en zumos de naranja y manzana. El análisis está basada en la formación y extracción de pares iónicos, usando el nitrato de tetrabutilamonio y detección con espectrofotómetro de fotodiodos integrados. El límite de detección para los dos nitrofenoles fue de 0.03 mg/L (34).

Norwitz, Nataro y Keliher estudiaron 42 compuestos fenólicos a través de destilación semimicro y usando la espectrofotometría ultravioleta. En este estudio incluyeron los fenoles contaminantes prioritarios, con excepción del pentaclorofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 4-cloro-3-metilfenol (35).

Romero y colaboradores han realizado la determinación de fenoles a través de diazotación con 2,4,6-trimetilanilina en medio micelar, observando un límite de detección del orden de 0.2 - 4.6 mM, con una repetibilidad del orden de

2% (36). Otros reactivos utilizados son la o-toluidina (37), la bencina (38) y las sales de amonio cuaternario (34, 39 - 41).

Navarro Villoslada y colaboradores hacen la determinación de fenoles individuales mediante la aplicación de métodos de análisis multicomponente como la regresión lineal múltiple de mínimos cuadrados (39 - 41).

Igualmente, Cladera y colaboradores determinan fenoles mediante análisis multicomponente (42).

Liu y Yu llevan a cabo un estudio de los aspectos de la aplicación del denominado Filtro de Kalman para el análisis espectrofotométrico multicomponente (43). También Pérez Arribas y colaboradores usan el Filtro de Kalman para la calibración multicomponente en un sistema real y su comparación con métodos de calibración de componentes puros (44).

Dentro del análisis multicomponente se destaca la comparación de cinco métodos de calibración multivariante llevado a cabo por Navarro Villoslada y colaboradores para la determinación de cuatro clorofenoles (45).

Navarro Villoslada y colaboradores hacen un estudio comparativo de tres métodos de análisis multicomponente: regresión de mínimos cuadrados, Filtro de Kalman y regresión parcial de mínimos cuadrados, para la determinación de cinco clorofenoles contaminantes prioritarios en agua de grifo, mediante un sistema FIA (Análisis de Inyección en Flujo) con extracción líquido-líquido. Los clorofenoles son preconcentrados en una resina XAD-4, siendo determinados a niveles de $\mu\text{g/L}$ (46).

Velasco y colaboradores, también determinan clorofenoles utilizando el Filtro de Kalman y análisis multicomponente (47).

Verdú Andrés y colaboradores mediante la utilización del método de las adiciones estándar, determinan un fenol en presencia de otros dos en mezclas ternarias comparando estos dos últimos como interferentes y obteniendo resultados comparables a los obtenidos utilizando una regresión lineal múltiple (48).

Montero Escolar y colaboradores llevan a cabo la determinación de nitrofenoles y clorofenoles, los cuales son previamente preconcentrados en una columna rellena de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG) al nivel de 1.0 mg/L (49).

Moreno Roman y colaboradores han propuesto un sistema en continuo para la determinación de pentaclorofenol en una columna rellena de oxina inmovilizada en CPG. El límite de detección fue de 2.5 μg , siendo el factor de preconcentración de 250 veces (50).

En la tabla 3 se presentan algunas características de los métodos para la determinación de fenoles por espectrofotometría ultravioleta-visible.

Tabla 3. Análisis de fenoles por espectrofotometría UV-VIS

Analito	Reactivo	λ , nm	Linealidad	Muestra	Observaciones	Ref.
Fenoles	4-AAP	270 - 320	-	-	L.D. < $\mu\text{g/L}$	27
PCF	-	297 - 304	1 - 40 mg/L	madera	Derivada	29
Fenoles	Br/I	223	8 - 160 mg/L	aguas	L.D. = $1.1\mu\text{L}$	30
NF	TBA	260 y 410	0.1 - 12mg/L	zumo de fruta	L.D. = 0.03mg/L	34
Fenoles	-	270 - 320	-	-	Destilación	35
Fenoles	2,4,6-TMA	380 - 500	-	medicamento	L.D. = 0.2-4.6mM	36
NF	Bendicina	535	40 - 70 $\mu\text{g/L}$	aire	L.D. = 0.1-0.7 $\mu\text{g/L}$	38
CF	TBA	250 - 280	2 - 20mg/L	-	Análisis Multicomponente	41
CF	TBA	200 - 430	0 - 200 $\mu\text{g/L}$	agua de grifo	Calibración Multivariante	46
PCF	-	302	0.04 - 0.25 $\mu\text{g/L}$	aguas	FIA	50

 λ = longitud de onda

Ref. = referencia

L.D. = límite de detección

4-AAP = 4-aminoantipirina

PCF = pentaclorofenol

CF = clorofenoles

TMA = 2,4,6-trimetilanilina

TBA = tetrabutilamonio

NF = nitrofenoles

FIA = análisis de inyección en flujo

2.2.2. 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 líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía de gases (CG).

2.2.2.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia se ha utilizado con gran profusión para el análisis de compuestos fenólicos. La mayoría de las aplicaciones se han llevado a cabo para la determinación de fenoles en agua (51 - 55). Pero, hay otras aplicaciones en muestras como madera (56), residuo de explosivo (57) y orina humana (58).

La cromatografía líquida de alta eficacia se utiliza para la determinación de mezclas complejas de fenoles, pero dado que la concentración de algunas muestras son bajas es necesario llevar a cabo una etapa ya sea de extracción en fase sólida (59 - 61), extracción líquido-líquido (62, 63) o destilación (64).

Se han utilizado varias fases estacionarias, sin embargo las que han dado mejores resultados son las fases ligadas en cromatografía de fase inversa (65 - 67) y otras poco utilizadas de fase normal (68, 69).

Con relación a las fases móviles en isocrático o gradiente, las más usadas son las que utilizan el metanol y/o acetonitrilo (51, 52, 54, 59), siendo a veces necesario añadir acetato amónico (56, 66) o ácido acético (70), 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 (67, 71).

Con relación a los detectores, el más utilizado es el detector ultravioleta-visible, por su respuesta selectiva a 254 nm y 280 nm (72 - 77), pero hay trabajos en que se determina el pentaclorofenol a 302 nm (53, 59, 72) y a 310 nm (55, 73, 78).

Polo Díez y colaboradores han separado también mezclas de los fenoles contaminantes prioritarios usando el detector ultravioleta-visible, variando la longitud de onda en cada caso (66).

Para la determinación de cloro- y nitrofenoles, incluyendo el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, también se ha usado el detector ultravioleta-visible (75).

También se han utilizado detectores electroquímicos (60, 61, 78), coulombimétrico (79) y de espectrofotometría de diodos integrados (53, 54, 59).

La cromatografía líquida permite la determinación de fenoles a bajas concentraciones, siendo posible disminuir los límites de detección a niveles de $\mu\text{g/L}$ e incluso a niveles de ng/L .

Di Corcia, Marchese y Samperi llevan a cabo la determinación selectiva de fenoles en agua, alcanzando límites de detección entre 0.2 - 2.0 $\mu\text{g/L}$ (52).

Puig y Barceló hacen la determinación de los fenoles contaminantes prioritarios, también en agua a niveles entre 0.1 - 5.0 $\mu\text{g/L}$ (55).

Cardellicchio y colaboradores determinan diversos compuestos fenólicos en agua de mar y sedimentos marinos, con límites de detección a niveles de ng/L , dependiendo del tipo de fenol (61).

En los últimos años, se han utilizado diversos métodos matemáticos y diseños experimentales para optimizar las condiciones de separación e identificación de los fenoles a través de la cromatografía líquida en fase inversa. La fase móvil es el parámetro que más se optimiza, tanto en elución isocrática (54, 57) como en gradiente (61, 80).

Chee y colaboradores llevan a cabo un estudio para la optimización de parámetros para la separación de los fenoles contaminantes prioritarios, usando un diseño factorial fraccionado, llamado matriz de diseño ortogonal (OAD) (81).

Por otra parte, Markowski y colaboradores hacen una simulación por ordenador, para la optimización de la separación de fenoles contaminantes prioritarios, con excepción del 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2-nitrofenol (82).

En la tabla 4 se presentan las características y aplicaciones de los métodos usuales de determinación de fenoles por cromatografía líquida de alta eficacia.

Tabla 4. Análisis de fenoles por cromatografía líquida de alta eficacia

Analito	F.E.	F.M.	Det.	Muestra	Obs.	Ref.
Fenoles	LC-18	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	UV	agua río, potable	L.D. < 0.1µg/L	52
FCP	Spherisorb ODS-2	MeOH-AcH	UV	agua río, grifo	L.D.= 65-100ng/L	53
FCP	Hypersil C-18	MeOH-ACN-AcH	UV	agua río, potable	L.D.= 0.1-5µg/L	55
Fenoles	Pecosphere C-18	MeOH-H ₂ O-AcH	UV	Orina	L.D.= 0.5-1mg/L	58
FCP	Spherisorb ODS-2	MeOH-AcH	UV	agua río, grifo	L.D.= 0.1-2µg/L	59
Fenoles	Lichospher RP-18	MeOH-ACN	EQ	agua mar	L.D < 0.5µg/L	60
Fenoles	Supelco RP-C8	ACN-AcH	UV/EQ	agua mar	L.D.= ng/L	61
Fenoles	Spherisorb ODS-2	AcH-MeOH	UV	agua río	L.D. < 0.5µg/L	63
FCP	Nucleosil C-18	NH ₄ Ac-ACN-MeOH	UV	-	Linealidad:5-50mg/L	66
FCP	HP ODS-2	AcH-MeOH	UV	Aguas	Linealidad:1-20µg/L	70
FCP	Spherisorb ODS-2	AcH-MeOH	UV	Aguas	L.D. < µg/L	72
NF	LC-18	MeOH-H ₂ O	UV	Pesticida	-	75
FCP	Waters C-18	MeOH-ACN	UV/EQ	agua río	L.D. < 1.0ng/L	78

F.E. = fase estacionaria

F.M. = fase móvil

Det. = detector

Obs. = observaciones

Ref. = referencia

FCP = fenoles contaminantes prioritarios

L.D. = límite de detección

UV=ultravioleta-visible

EQ = electroquímico

ACN = acetonitrilo

MeOH = metanol

AcH = ácido acético

NF = nitrofenoles

NH₄Ac = acetato amónico

2.2.2.2. Cromatografía de gases (GC)

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.

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 (83 - 85) y la extracción en fase sólida (83, 86, 87). Actualmente se ha comenzado a utilizar la microextracción en fase sólida para estos tipos de compuestos (88 - 90).

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 (91 - 94) es el tipo de derivatización más usada para los fenoles. Pero también se utilizan otros reactivos, cloruro de pentafluorobenzoilo (95, 96), bromuro de pentafluorobenzoilo (97) y derivados de éteres (98, 99).

Con relación a la fase estacionaria, hay una gran variedad de columnas, como se observa en la revisión hecha por Bosch Reig y colaboradores (100). 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 (83, 90, 94, 101 - 108). Otros métodos utilizan columnas empaquetadas (99, 109, 110).

Williams y colaboradores hacen un estudio de varios compuestos fenólicos y demuestran que las columnas con una menor polaridad presentan mayor eficacia que las columnas de más polaridad (111).

En relación a los detectores los más utilizados son detector de ionización de llama (FID) (84, 86), detector de captura electrónica (ECD) (85, 93) y detector de espectrometría de masas (MS) (83, 89, 91). Los métodos analíticos oficiales USEPA 604 y 625, utilizan para la determinación de fenoles por cromatografía de gases los detectores de ionización de llama, de captura electrónica o espectrometría de masas (112). Pero, también se han utilizado otros detectores como el de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (92), detector de nitrógeno-fósforo (NPD) (113) y detector de emisión atómica (AED) (94).

Recientemente han aparecido revisiones bibliográficas sobre análisis de fenoles en agua y se detallan las condiciones utilizadas en cromatografía de gases (114 - 116). La determinación de fenoles por cromatografía de gases se utiliza no solamente en muestras de agua (85, 92, 94), sino también en muestras de humo de cigarrillo (89), orina (99) y aire (93). De un modo general, mediante la derivatización se pueden determinar fenoles al nivel de $\mu\text{g/L}$, debido al aumento de la sensibilidad y a la mayor recuperación con que se pueden extraer los derivados fenólicos. Rodríguez y colaboradores llevan a cabo la separación de clorofenoles en agua con límite de detección de 0.5 ng/mL (94). Lee y colaboradores determinan compuestos fenólicos en suelo con límite de detección de 0.1 $\mu\text{g/L}$ (90).

En la Tabla 5 se presentan algunas características y aspectos instrumentales de los métodos de separación y determinación de fenoles por cromatografía de gases.

Tabla 5. Análisis de fenoles por cromatografía de gases

Analito	F. E.	Detector	Muestra	Der.	Observaciones	Ref.
NF	DB-5	ECD	agua	—	extracción L-L	85
Fenoles	SBP-1	FID	agua	—	extracción FS	86
Fenoles	PTE-5	FID	agua	acetilación	microextracción FS	88
Fenoles	HP DB-5 MS	MS	Cigarro	—	microextracción FS	89
CF	DB-5	MS	Suelo	metilación	L.D. = 0.1µg/L	90
CF	HP-5	MS	orina	acetilación	L.D. = 1.1-15.9ng/mg	91
Fenoles	BP-5	FTIR	agua potable	acetilación	L.D. = 0.1µg/mL	92
CF	DB-225	ECD	aire	acetilación	L.D. = 1 ng/m ³	93
CF	DB-5	AED	agua	acetilación	L.D. = 0.5 ng/mL	94
PCF	OV-17	ECD	agua residual	PFBz	hidrólisis	95
CF	DB-1	ECD	agua natural	PFBz	L.D. = 0.1µg/L	97
PCF	Dexsil 300	MS	agua	metilación	extracción L-L	98
PCF	OV-210	ECD	orina	metilación	L.D. = 1µg/L	99
Fenoles	HP-1	FID	agua	—	Extracción FS	101
FCP	DB-5	FID	Agua	acetilación	Extracción FS	103

F.E. = fase estacionaria

L.D. = límite de detección

MS = detector de espectrometría de masas

AED = detector de emisión atómica

FID = detector de ionización de llama

PFBz = pentafluorobencilación

ECD = detector de captura electrónica

FCP = fenoles contaminantes prioritarios

FTIR = espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

CF = clorofenoles

FS = fase sólida

L-L= líquido-líquido

Der. = derivatización

Ref. = referencia

NF = nitrofenoles

PCF = pentaclorofenol

2.2.2.3. 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.

Ong, Lee y Li llevan a cabo la separación de los once fenoles contaminantes prioritarios, usando como fase móvil una mezcla de dióxido de carbono (CO₂) y clorodifluorometano como fluido supercrítico y una columna capilar de sílice-fundida, con detección ultravioleta-visible. Los límites de detección fueron entre 0.01 - 3.80 mg/L para los once fenoles (117). La utilización de clorodifluorometano reduce los tiempos de retención de los fenoles y aumenta la sensibilidad, comparando con la utilización de CO₂ puro (118).

Dressmann y colaboradores llevan a cabo la determinación de fenoles utilizando CO₂ modificado con metanol y detección electroquímica, alcanzando límites de detección entre 0.72 - 80 ng (119).

Reighard y Olesik hacen la separación de fenoles contaminantes prioritarios y nitroaromáticos, haciendo una comparación entre el CO₂ en estado supercrítico y CO₂ modificado con metanol (120). Hay trabajos que estudian el efecto de la presión, temperatura, modificador y concentración del modificador, para diferentes compuestos fenólicos usando el CO₂ como fluido supercrítico (121).

2.2.3. Métodos automáticos

Los métodos automáticos son aquellos que usan sistemas en los que se incorpora un elemento que no requiere la decisión de un operador. Los principales objetivos que se desean obtener con los procesos automáticos son: procesar un número elevado de muestras, determinar varios componentes de una muestra, disminuir la intervención del operador para evitar errores, disminuir el consumo de muestra y reactivos, reduciendo así los costos del análisis. Por eso, el impacto de la automatización sobre la productividad en un laboratorio analítico es evidente por si mismo (122).

Pocurull y colaboradores llevan a cabo la automatización para preconcentrar y separar los once fenoles contaminantes prioritarios en agua de río y de consumo. La preconcentración se realiza en línea con una precolumna del copolímero estireno-divinilbenceno (PLRP-S) y adición del reactivo bromuro de tetrabutylamonio (TBA) como par iónico. La separación de los fenoles se realizó con una columna Spherisorb ODS-2 con fase móvil metanol - agua. Se han utilizado tanto el detector electroquímico (123) como los detectores ultravioleta-visible y electroquímico (124).

Slobodnik y colaboradores automatizan el análisis de pesticidas fenólicos por cromatografía líquida en varias muestras de agua; entre los analitos se incluyen el pentaclorofenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (125), así como 2-nitrofenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (126); la preconcentración se lleva a cabo en línea, se utiliza la elución con gradiente y detector espectrofotómetro de fotodiodos integrados. Los límites de detección fueron del orden de 0.1 µg/L.

Lamprecht y Huber llevan a cabo la separación de los once fenoles contaminantes prioritarios en muestras de agua superficial y potable, usando la cromatografía líquida de alta eficacia con reacción de derivatización en línea. Los fenoles son concentrados por extracción líquido-líquido con diclorometano y después se evapora el disolvente orgánico. Para la separación se utilizó una columna de octadecilsilano con un gradiente agua-acetonitrilo. Inicialmente se detectan los dinitrofenoles mediante espectrofotometría ultravioleta-visible,

seguido por la oxidación de los fenoles con cerio (IV) en un reactor de flujo tubular y detección fluorescente (127).

Nielen y colaboradores describen la determinación de fenoles en agua de río y grifo a bajas concentraciones del orden de 10 $\mu\text{g/mL}$ por cromatografía líquida con una precolumna de preconcentración en línea, empaquetada con el copolímero estireno-divinilbenceno (PRP1). La separación se realiza con una columna analítica CP-Spher C-18 y la detección es fluorescente (128).

Dado que hay varios grados de automatización, citaremos algunas determinaciones de fenoles por análisis de inyección en flujo (FIA), pues los mismos son considerados semi-automáticos, o sea hay etapas que no requieren la intervención del operador.

Kwade, Voigtländer y Cammann llevan a cabo la preparación y determinación de fenoles en línea mediante análisis en flujo. Los fenoles reaccionan con la 4-aminoantipirina, produciendo la subsecuente oxidación de la imina. La imina es extraída con cloroformo y la absorción se mide en el espectrofotómetro. El límite de detección es de 0.01 mg/L (129).

Gonzalo y colaboradores determinan fenoles por análisis de inyección en flujo en muestras de keroseno y nafta. El método se basa en la reacción de los fenoles con 4-aminoantipirina en presencia de un agente oxidante ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), usando una membrana de silicona para la extracción y separación de los fenoles. La detección se lleva a cabo mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (130).

Brouwer y Brinkman llevan a cabo la determinación en línea de clorofenoles y nitrofenoles por cromatografía líquida en aguas superficiales usando elución en gradiente y detección con un espectrofotómetro de fotodiodos integrados con límite de detección a niveles de $\mu\text{g/L}$ (131).

Brouwer y colaboradores hacen un estudio en línea para la determinación por cromatografía líquida de contaminantes polares en agua de grifo, incluyendo el 2-nitrofenol y pentaclorofenol. El sistema utiliza para la preconcentración precolumna empaquetada con el polímero estireno-divinilbenceno (PLRP-S). La

detección se lleva a cabo con espectrofotometría ultravioleta-visible, con límite de detección a niveles de $\mu\text{g/L}$ (132).

2.2.4. Otros métodos analíticos

Además de los métodos citados, hay otros que también se han aplicado para el análisis de los fenoles.

Dennison, Hall y Turner preparan un microbiosensor capaz de medir bajos niveles de vapor de fenol y se basa en la enzima polifenoloxidasasa o tirosinasa, la cual cataliza la oxidación de los fenoles a catecol y después a quinona. Las medidas se llevan a cabo en un analizador electroquímico y el límite de detección depende de la humedad relativa y del tiempo de exposición del vapor de fenol. Con 40% de humedad relativa, el límite de detección fue de $29 \mu\text{g/mL}$ de fenol, para una exposición de 100 segundos (133).

Wang y colaboradores usan un biosensor amperométrico para determinar fenoles basado en un nuevo biocomposite, mediante la incorporación de la enzima tirosinasa en la resina de grafito-epóxido. Los fenoles fueron analizados en flujo a una velocidad de 50 muestras por hora, con un límite de detección $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (134).

Wang y Li utilizan técnicas electroanalíticas para el análisis de fenoles como la polarografía, voltamperometría, valoración coulombimétrica y potenciométrica, usando diversos electrodos (135).

Guijarro y colaboradores llevan a cabo la determinación de 3-nitrofenol mediante voltamperometría con un electrodo del polímero de 3-metiltiofeno recubierto con carbón vitrificado (136).

La cromatografía electrocinética en medio micelar se basa en la separación de los distintos compuestos por aplicación de un campo eléctrico entre

los extremos de la columna. Para favorecer el paso de la corriente se utilizan disoluciones reguladoras y la separación de los compuestos depende de la magnitud y signo de la carga, tamaño de la molécula, propiedades adsorbentes del soporte, voltaje aplicado e intensidad de corriente.

Terabe y colaboradores llevan a cabo la separación de fenoles por cromatografía electrocinética en medio micelar usando una columna capilar de sílice con una disolución micelar de dodecilsulfonato sódico y utilizando el tampón fosfato-borato de pH 7. La separación se realiza con detección ultravioleta-visible (137).

Otsuka y colaboradores también hacen un estudio de la separación de clorofenoles por cromatografía en medio micelar, utilizando columna de sílice fundida rellena con una disolución de dodecilsulfonato sódico 0.07M a pH 7, con detección ultravioleta-visible (138).

Lin y Lin hacen un estudio de la separación de diclorofenoles usando cartuchos capilares de sílice-fundida, disolución micelar de dodecilsulfonato sódico y tampón fosfato-borato. Se estudia la variación de la movilidad de un analito en función del pH de la disolución tampón. La detección se lleva a cabo con detector ultravioleta-visible (139).

La electroforesis capilar es una técnica que ha sido desarrollada durante los últimos años para el análisis de los fenoles. Turnes y colaboradores estudian la determinación de pentaclorofenol en muestras de agua a niveles de ng/L (140). Li y Locke llevan a cabo el estudio de la influencia del pH, concentración de la disolución reguladora, voltaje aplicado y cantidad de muestra inyectada, para la determinación de fenoles contaminantes prioritarios a niveles de mg/L por electroforesis capilar (141). Martínez y colaboradores hacen la separación de los fenoles contaminantes prioritarios, usando la electroforesis capilar con detección espectrofotométrica ultravioleta-visible (9).

Por otra parte, se destaca el desarrollo de inmunoensayos para la determinación de pentaclorofenol en muestras de agua con un límite de detección entre 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ (142).

Se estudia un método de detección selectivo de impurezas de fenol en agua basado en un proceso de ablación e ionización mediante un láser y posterior detección con espectrometría de masas (MS), alcanzando un límite de detección de 0.1 µg/L (143).

2.3. REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE FENOLES

2.3.1. Introducción

Cuando el contenido de fenoles de la muestra se encuentra por debajo del límite de detección es necesario la utilización de métodos de preconcentración previos al análisis. 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.

2.3.2. Métodos de extracción en fase sólida

En la extracción en fase sólida los analitos tienen afinidad por una fase sólida o por una fase líquida ligada a un soporte sólido. 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 adsorberse.

Los adsorbentes más usados son los que contienen, carbón, polímeros porosos (144) y materiales de fase ligada (145). Hay dos tipos de carbón frecuentemente utilizados como adsorbentes: carbón activado y negro de carbón grafitizado.

El carbón activado se prepara a bajas temperaturas por la oxidación del carbón vegetal y posee un área superficial de 300 - 2000 m²/g, con una estabilidad térmica de 700°C y una superficie heterogénea que contiene grupos funcionales, que incluyen grupos fenólicos, carboxílicos, quinónicos y lactonas. Sin embargo, presentan varios problemas que afectan fundamentalmente a la determinación de los analitos en muestras acuosas: adsorción del agua, adsorción irreversible y/o degradación de los analitos. Para minimizar estos problemas se ha usado el negro de carbón grafitizado, el cual no es específico, no tiene características porosas, posee una alta homogeneidad y propiedades hidrofóbicas. El proceso de grafitización elimina la adsorción específica y retarda la formación de enlaces de hidrógeno; como consecuencia, moléculas como el agua, no son tan fuertemente adsorbidas. Posee un área superficial de 6 - 100 m²/g y una estabilidad térmica de hasta 400°C.

Los polímeros porosos más frecuentemente usados son Tenax, Chromosorb, Poropak, HayeSep, resina Amberlita XAD y Poliuretano. En la tabla 6 presentamos algunos ejemplos y principales características de polímeros porosos utilizados para la preconcentración de trazas de compuestos orgánicos volátiles.

El mecanismo de adsorción en los polímeros porosos para los compuestos orgánicos en muestras acuosas es muy similar al que ocurre en el carbón, pero las recuperaciones son generalmente más altas.

Las resinas tipo XAD también se han utilizado para preconcentrar fenoles y pueden ser muy hidrofóbicas como la XAD-2 o moderadamente hidrofóbicas como la XAD-7.

Con relación a los materiales de fase ligada, hay varios que están disponibles comercialmente y normalmente se utiliza un soporte inorgánico inerte basado en un material de sílice, aunque también hay disponibles fase ligadas sobre materiales poliméricos.

Tabla 6 - Principales características de polímeros porosos utilizados para la preconcentración de compuestos orgánicos volátiles

Adsorbente	Composición	Área superficial, m ² /g	Temperatura, °C
Tenax GC	Oxido 2,6-difenil-p-fenileno	19 - 30	450
Chromosorb 101	Estireno-divinilbenceno	350	275
Chromosorb 106	poliestireno	700 - 800	225
Poropak P	Estireno-divinilbenceno	100 - 200	250
HayeSep D	Divinilbenceno	795	290
XAD-2	Estireno-divinilbenceno	300	200
XAD-7	Resina polimetacrilato	450	150
XAD-8	Resina polimetilmetacrilato	140	150

En la tabla 7 se presenta las características de algunos adsorbentes de fase ligada sobre gel de sílice usados para preconcentración.

Tabla 7 - Características de adsorbentes de fase ligada sobre gel de sílice usados para preconcentración

Adsorbente	Tipo de Muestra	Aplicaciones Típicas
Octadecilo (ODS, C ₁₈)	Extracción en fase inversa de compuestos no polares	drogas, aceites esenciales, conservantes, vitaminas, plastificantes, pesticidas, hidrocarburos
Octilo (C ₈)	Extracción en fase inversa de compuestos moderadamente polares	contaminantes prioritarios y pesticidas
Cianopropilo	Extracción en fase normal de compuestos polares	aminas, alcoholes, vitaminas y fenoles
Gel de sílice	Adsorción de compuestos polares	drogas, alcaloides, aminoácidos, micotoxinas, compuestos heterociclos, lípidos, ácidos orgánicos y vitaminas

Pocurull y colaboradores llevan a cabo la comparación de tres adsorbentes C₁₈, ciclohexil y poliestireno divinilbenceno, para la preconcentración de fenoles; se observa que la presencia de un reactivo formador de pares iónicos mejora la recuperación de los fenoles en los diferentes adsorbentes, obteniéndose los mejores resultados con poliestireno (PLRP-S) (63, 70).

Puig y Barceló comparan los adsorbentes C₁₈, C₈, C₂, ciano, fenil, ciclohexil y poliestireno divinilbenceno, concluyendo que aquellos adsorbentes más polares como C₂, ciano y fenil, no dan buenos resultados. Los adsorbentes ciclohexil y poliestireno (PLRP-S) dan, en general, mejores resultados para todos los fenoles estudiados, principalmente para aquellos fenoles que poseen una gran deslocalización electrónica, como los nitrofenoles o aquellos sustituyentes

aceptores de electrones, como los clorofenoles, además de interacciones hidrofóbicas con el adsorbente (73).

Werkhoven-Goewie y colaboradores llevan a cabo la preconcentración y análisis de clorofenoles en agua por cromatografía líquida, usando el adsorbente estireno-divinilbenceno y detección electroquímica (146).

Nielsen hace la preconcentración de clorofenoles en agua usando una columna C₁₈ de fase inversa y determinación por cromatografía de gases/espectrometría de masas, con límites de detección a niveles de 1 µg/L (147).

Los programas de monitorización de calidad del agua requieren la extracción de componentes orgánicos no volátiles y semivolátiles, siendo los métodos más frecuentemente usados para este propósito los métodos 3520 y 3510 de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) (148).

Berrueta y colaboradores llevan a cabo una revisión de la extracción en fase sólida, incluyendo nuevas fases sólidas, la microextracción sólido-líquido, para los experimentos en línea y no en línea (149).

Zheng-Liang, Ríos y Valcárcel usaron un sistema de flujo para la determinación de fenoles a niveles de ng/mL en agua y suelo, usando la extracción en fase sólida (150).

Di Corcia y colaboradores llevan a cabo la determinación de los fenoles contaminantes prioritarios en agua a niveles de trazas, usando para la extracción en fase sólida el negro de carbón grafitizado (151).

Biziuk y colaboradores llevan a cabo la determinación de contaminantes orgánicos en agua de grifo y de superficie, incluyendo los fenoles mediante extracción en fase sólida en un cartucho de C₁₈ (152).

Melcher y colaboradores utilizan membranas de silicona para la extracción en fase sólida del pentaclorofenol y otros fenoles en agua de desecho (153).

Kontsas y colaboradores llevan a cabo la determinación de clorofenoles en aire, usando gel de sílice y cartucho de C₁₈ como adsorbentes para la extracción (154).

Onuska hace una revisión de los procedimientos y técnicas para la preparación de muestras acuáticas para el análisis cromatográfico, incluyendo el estudio de fenoles y la extracción en fase sólida (155).

Silva Vargas y colaboradores llevan a cabo la preconcentración selectiva de clorofenoles usando oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (156).

2.3.3. Métodos de extracción líquido-líquido

En la extracción líquido-líquido una disolución (usualmente acuosa) se pone en contacto con un segundo disolvente (usualmente orgánico) esencialmente inmiscible con el primer disolvente, con el fin de provocar una transferencia de masa de uno o más solutos al segundo disolvente. La técnica es aplicable a muestras a nivel de traza y también a grandes cantidades.

La técnica de extracción líquido-líquido es ampliamente utilizada para separar los componentes de sistemas orgánicos. La extracción con disolvente permite conseguir una purificación y concentrar los analitos de interés, antes del análisis.

Cladera y colaboradores utilizan la extracción líquido-líquido para el análisis multicomponente de mezclas de fenoles y determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible. El método se ha aplicado a agua de grifo y agua de desecho, siendo el n-hexano el disolvente que mejores resultados ha dado (157).

Farrel y Pacey utilizan un extractor líquido-líquido para estudiar la recuperación de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles incluyendo los fenoles contaminantes prioritarios, usando el cloruro de metileno para la extracción (158).

Korenman y colaboradores llevan a cabo la extracción de clorofenoles usando los disolventes orgánicos como acetona, metiletilcetona, n-metilpirrolidona y 4-butirolactona (159).

Ormad y colaboradores hacen la caracterización de microcontaminantes orgánicos en agua de río, incluyendo el fenol y 2-nitrofenol, usando la extracción líquido-líquido. El disolvente utilizado fue el cloruro de metileno y la determinación se realizó por cromatografía de gases/espectrometría de masas (160).

Sin embargo, la utilización de estabilizantes y conservantes en los disolventes orgánicos puede ser una fuente de interferencias. Chen y colaboradores identifican diferentes compuestos que se han formado durante la extracción líquido-líquido, aplicando el método EPA 625, debido a la presencia de ciclohexeno en el cloruro de metileno utilizado en la extracción, el cual da lugar a procesos de halogenación y autoxidación (161).

Otros problemas cuando se utiliza la extracción líquido-líquido son la formación de emulsiones, la dificultad de observar la separación de las dos fases y la extracción de grandes volúmenes de muestra. Actualmente, es posible reducir el volumen de disolvente orgánico de manera que se reduzca el tiempo de extracción, la contribución de los interferentes y los costes. En este sentido, Barth y Fair usan la microextracción líquido-líquido para la determinación de clorofenoles (162).

2.3.4. Otros métodos de extracción y preconcentración

La extracción en fluidos supercríticos (SFE) es una técnica alternativa para la extracción directa de los fenoles, como también para la elución de los fenoles preconcentrados en un adsorbente (163, 164).

Hawthorne y Miller hacen un estudio comparativo del tiempo de extracción en fluido supercrítico, aproximadamente 30 minutos, con la extracción Soxhlet, que lleva 18 horas, para el análisis de clorofenoles en muestras medioambientales (165).

También se ha utilizado para la extracción de fenoles la destilación (64) y la partición centrífuga (166).

2.4. GENERALIDADES SOBRE LA INMOVILIZACIÓN DE REACTIVOS

2.4.1. Introducción

Cuando el contenido de analito en la muestra se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica se requiere una preconcentración previa al análisis. De esta forma se consigue un aumento de sensibilidad y es posible eliminar interferencias debidas a otros componentes que pueden interferir en la determinación de los analitos, con lo que se obtiene un aumento de la selectividad.

La utilización de un compuesto inmovilizado es una técnica de preconcentración que permite mejorar el límite de detección, reducir el efecto matriz y aumentar la exactitud de los resultados analíticos, además de otras ventajas sobre otras técnicas de preconcentración tales como la filtración, la extracción y el cambio iónico.

La preconcentración utilizando compuestos inmovilizados tiene la ventaja de reducir el volumen de disolvente para eluir el analito, es posible utilizar grandes volúmenes de muestra sin que la preconcentración pierda eficacia y se aumenta la selectividad, además de permitir un elevado número de aplicaciones ya que hay una gran variedad de sustratos y compuestos que es posible inmovilizar.

Probablemente, el área donde la inmovilización ha tenido un mayor desarrollo es en *cromatografía* y en *análisis enzimático*.

2.4.2. Métodos de inmovilización de reactivos

2.4.2.1. Métodos físicos

Los métodos físicos se caracterizan por que no existe una unión química entre el compuesto a inmovilizar y el soporte. Dentro de estos métodos se destacan la adsorción, el atrapamiento y la microencapsulación.

En el método de adsorción, el compuesto a inmovilizar se adsorbe sobre la superficie activada de un soporte adecuado, que puede ser alúmina o sílice, siendo necesario poner en contacto la disolución del compuesto a inmovilizar con una superficie activada de un adsorbente.

La adsorción sobre matrices insolubles en agua puede ser debida a un mecanismo de cambio iónico, a la simple adsorción física sobre la superficie externa de la partícula o a las uniones físicoquímicas provenientes de interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van de Waals. El modo de adsorción dependerá fundamentalmente de la naturaleza del portador insoluble en agua (167, 168).

La reactividad de un compuesto adsorbido varía en cada caso; en el caso de las enzimas hay situaciones favorables en que la actividad relativa de una enzima inmovilizada es similar a la de la enzima soluble. Sin embargo, la actividad se describe solo cualitativamente como activa o no. La actividad relativa para la leucina amino-peptidasa en gel fosfato cálcico es de 78% respecto a la enzima disuelta (169).

Ogino observó cambios en el comportamiento del compuesto inmovilizado en relación al compuesto individual, que implican un cambio de especificidad. La dextransucrosa adsorbida en DEAE (dietil-amino-etil) tuvo un cambio en su especificidad, con respecto a la enzima disuelta (170).

También la estabilidad térmica del compuesto inmovilizado puede tener o no cambios. Sundaram y Crook encontraron una estabilidad similar en la ureasa adsorbida en caolinita (171).

Además de la inmovilización de enzimas, también se han inmovilizado otros compuestos como oligonucleótidos mediante adsorción en un soporte sólido. El método comprende dos pasos fundamentales el contacto de una disolución de oligonucleótidos con el soporte sólido y posterior etapa de secado de la disolución sobre el soporte. Tsung-Hui y Joaneln usan los oligonucleótidos inmovilizados en soportes sólidos para retener secuencias de ácidos nucleicos. Mediante este método se construyó una secuencia de DNA para detectar las mutaciones genéticas que causan la fibrosis cística (172).

Un aspecto importante de la inmovilización por adsorción es la reversibilidad. Un cambio de pH, fuerza iónica, o un cambio de temperatura, pueden causar que el compuesto se desadsorba.

Las principales ventajas de la inmovilización de reactivos sobre soportes sólidos mediante adsorción son la gran cantidad de materiales adsorbentes disponibles, la facilidad de preparación y la posibilidad de inmovilizar en condiciones poco enérgicas.

Como principales desventajas son la facilidad de la desorción debida a la reversibilidad del proceso y la falta de reproducibilidad.

En cuanto al método de atrapamiento, el compuesto se inmoviliza dentro del espacio intersticial de polímeros entrecruzados insolubles en agua. Este método se basa en la formación de redes altamente entrecruzadas de un polímero en presencia del compuesto a inmovilizar.

El polímero entrecruzado más común es el sistema gel poliacrilamida; pero también se usan la goma de silicona (silastic) y la gel de sílice.

Hicks y Updike llevaron a cabo un estudio de las características y actividad de la lactato deshidrogenasa inmovilizada en gel poliacrilamida, observando que la mejor resistencia mecánica fue para altas concentraciones de gel (173).

La resina silastic, que contiene relleno de sílice y un catalizador, también se ha utilizado para el atrapamiento. El reactivo a inmovilizar se prepara por adición al compuesto de un exceso de resina silastic. Brown y colaboradores han

obteniendo buenos resultados con enzimas tales como la tripsina y la quimitripsina (174).

También se han utilizado geles de almidón para la preparación de espuma de poliuretano, forrada con enzimas inmovilizadas (175, 176).

Las principales ventajas de la inmovilización por atrapamiento, son su simplicidad de operación, la gran cantidad de posibles portadores que permiten la preparación de inmovilizaciones en muy diferentes formas físicas, así como la ventaja de tratarse de un método físico.

Por otro lado, la inmovilización por atrapamiento también presenta algunas desventajas como su delicado balance de factores, la naturaleza física del polímero entrecruzado, que debe ser definida, para obtener una buena reactividad; pues el tamaño del microporo de la red debe ser adecuado para que el compuesto inmovilizado sea reactivo y no se produzca la pérdida del mismo por dichos poros.

Con relación al método de microencapsulación, el compuesto es inmovilizado dentro de microcapsulas formadas por membranas semipermeables, permanentes o no. Las membranas permanentes están formadas por polimerización interfacial o por coacervación de polímeros preformados. Las membranas no permanentes o membranas líquido-tensoactivo se forman por la combinación apropiada de tensoactivos, aditivos y cadenas hidrocarbonadas.

La inmovilización de compuestos dentro de microcapsulas con membranas semipermeables permanentes está basada en la permeaselectividad de la membrana. La molécula del compuesto es más grande que la media del diámetro de poro de la membrana esférica dentro de la cual está atrapada y no puede difundirse a través de la membrana a la disolución externa.

Se han empleado microcapsulas permanentes producidas por coacervación para la inmovilización de enzimas en nitrato de celulosa (177) y etilcelulosa (178). Con relación a las producidas por polimerización interfacial están restringidas al sistema poliamida (Nailon).

Para enzimas se ha observado, por ejemplo, que la anhidrasa carbónica microencapsulada retenía un 10% de su actividad normal mientras que la eritrocita mantenía un 80% (179).

Los factores que influyen en el espesor de la membrana y por consiguiente en la permeabilidad son la composición del disolvente orgánico, la concentración y la naturaleza química de los compuestos usados para hacer la membrana y el tiempo de formación de la cápsula.

Las ventajas de la microencapsulación de compuestos radican en que este método de inmovilización provee de una gran área de contacto superficial, en un pequeño volumen. Además, la microencapsulación ofrece una doble selectividad en primer lugar debida al compuesto inmovilizado y en segundo lugar debida a la membrana semipermeable.

Las desventajas de la microencapsulación incluyen elevada concentración necesaria para la formación de microcapsulas, las pérdidas de reactividad ocasionales, la posibilidad de que el compuesto a inmovilizar se incorpore dentro de la pared de la membrana y que no es adecuada para compuestos de elevado peso molecular.

Con relación a las microcápsulas no permanentes, los métodos son análogos a los de las membranas permanentes. Están basados en una membrana líquido-tensoactivo, concepto originado y desarrollado por Li (180). El proceso de preparación es similar al descrito para las membranas permanentes; la disolución acuosa que contiene el compuesto es emulsionada con un tensoactivo de forma que la membrana líquida encapsula al compuesto. Cuando las microcápsulas están preparadas se transfieren a una disolución acuosa donde se pueden utilizar.

La composición de la membrana puede variar de acuerdo con las necesidades de uso. Generalmente la membrana está compuesta de tensoactivo, aditivos y parafina de alto peso molecular. Los aditivos se añaden para dar el carácter de membrana líquida, dado que el tensoactivo y aditivos alteran la selectividad y estabilidad física de la membrana.

2.4.2.2. Métodos químicos

Los métodos químicos se caracterizan por que se produce una reacción química entre el compuesto a inmovilizar y el soporte, además, cambian las propiedades intrínsecas de los compuestos.

Los métodos químicos son irreversibles, de forma que no se puede recuperar el compuesto. Los métodos más utilizados son el método del enlace covalente y el método de entrecruzamiento.

El método del enlace covalente se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de compuestos a inmovilizar y soportes funcionalizados que pueden ser de naturaleza polimérica.

La inmovilización de un compuesto por enlace covalente debe involucrar solamente el grupo funcional del compuesto que no sea esencial para los usos posteriores del compuesto.

Los soportes usados para la inmovilización de reactivos pueden ser inorgánicos u orgánicos y los materiales pueden encontrarse en la naturaleza o ser sustancias producidas sintéticamente.

Los soportes sintéticos más utilizados se basan en polímeros de poliacrilamida, poliestireno-divinilbenceno, anhídrido maleico o en ácido metacrílico. Los soportes naturales más usados son agarosa, polisacáridos (celulosa, cefarosa), Dextran (Sephadex), vidrio y almidón.

Hay varios métodos para unir covalentemente un compuesto a un soporte funcionalizado insoluble en agua. En función del soporte, podemos citar la azida carboximetilcelulosa (azida cm-celulosa); está comercializada y se activa con ácido nitroso para obtener la azida ácida. Esta se hace reaccionar con el compuesto que se desee inmovilizar. Este método se ha aplicado a las enzimas α -quimiotripsina y la tripsina (181).

El poli-p-aminoestireno se activa mediante ácido nitroso, fosgeno o tiofosgeno para dar la correspondiente sal de diazonio, isocianato o tioisocianato respectivamente. Está comercializado y su activación es sencilla. Con este método se han inmovilizado proteínas y albúminas.

Se han utilizado amino-alquil y amino-aril derivados de vidrio que hacen posible la inserción de un gran número de grupos funcionales en vidrio. Primero se prepara el aminoalquilderivado, que se transforma a su vez en un aril-derivado, con lo que se queda unido al vidrio mediante un enlace covalente. Marshall y Mottola han inmovilizado 8-hidroxiquinoleína con (aminofenil)trimetoxisilano (182).

Se han inmovilizado compuestos tales como 8-hidroxiquinoleína en sílice (182-185), en vidrio de poro controlado (CPG) (186-188), en resina de poliestireno-divinilbenceno (Amberlita XAD-2) (189), sobre cefarosa CL-4B (190). También se ha inmovilizado 3-aminofluoranteno en CPG, en gel de sílice y en celulosa (191), fluoresciamina en vidrio y en celulosa y EDTA en CPG (193).

Entre los factores que afectan al compuesto inmovilizado cabe destacar la capa de difusión de las partículas vecinas insolubles en agua, la repulsión estérica de los analitos, el tamaño molecular del polímero, la flexibilidad del esqueleto del polímero, el grado hidrofílico y las interacciones electrostáticas.

La reactividad de un compuesto inmovilizado con una unión covalente a un soporte puede ser mayor, igual o menor y depende de la clase de compuesto inmovilizado, del soporte y de las condiciones de la reacción de inmovilización.

Las cantidades de un compuesto inmovilizadas en un soporte pueden variar desde μg hasta mg/g . Se han observado niveles bajos en la unión con el soporte en el caso de la inmovilización de la proteína β -glucosidasa en el 2-amino-4,6-dicloro-s-triazil derivado de sepharosa (195). En algunos casos se ha correlacionado la reactividad del compuesto inmovilizado y la cantidad de compuesto por gramo de compuesto inmovilizado (196, 197).

El cambio de pH puede producir variación en la reactividad del compuesto inmovilizado, pues en algunos casos el portador está cargado ya que la

inmovilización puede producir cambios químicos. La carga neta de la matriz puede tener una gran influencia en las propiedades, debido al cambio de las condiciones microambientales del compuesto inmovilizado (198). El cambio de pH puede producir una ruptura del enlace covalente entre el compuesto y el soporte, como ocurre con la inmovilización de la 8-hidroxiquinolina en vidrio de poro controlado en la que se hidroliza el enlace a $\text{pH} > 10$ (182).

La estabilidad del compuesto inmovilizado depende además del pH, de la temperatura y tipos de disolventes empleados.

El enlace covalente de un compuesto a un soporte ofrece numerosas ventajas como método de inmovilización de compuestos. El acoplamiento del compuesto al soporte es experimentalmente fácil, el soporte es fácil de manejar; además se puede aplicar a una gran variedad de necesidades debido a la variación en la naturaleza física o química del soporte o sea en modo continuo, en reactores de agitación, en reactores empaquetados o en reactores de lecho fluidizado. También debido a la alteración de la estructura del compuesto inmovilizado, éste puede exhibir propiedades químicas o físicas superiores al compuesto sin inmovilizar.

Sin embargo, en algunos casos, la preparación del soporte y el proceso de inmovilización son laboriosos y las condiciones en las que se realizan pueden llegar a disminuir la reactividad del producto a inmovilizar.

El método de entrecruzamiento se basa en que el compuesto a inmovilizar se une a otros por enlace covalente mediante reactivos polifuncionales de bajo peso molecular formando un agregado, siendo las reacciones irreversibles. Se produce un entrecruzamiento intermolecular entre las moléculas del compuesto y el reactivo polifuncional. Para conseguir un entrecruzamiento intermolecular adecuado, es necesario un correcto conocimiento de las condiciones de reacción, para escoger la concentración del compuesto a inmovilizar y la del reactivo, así como el pH y la fuerza iónica de la disolución.

Una consideración importante es el grado de entrecruzamiento intramolecular entre un reactivo polifuncional y el compuesto a inmovilizar que es mayor a concentraciones bajas de ambos, pues a bajas concentraciones aumenta

la probabilidad de que los grupos del reactivo polifuncional reaccionen solamente con los grupos de una misma molécula del compuesto que se quiere inmovilizar y no de moléculas diferentes. El control de entrecruzamiento intermolecular o intramolecular es muy difícil experimentalmente y la inmovilización involucra por tanto ambos tipos de entrecruzamiento.

Los reactivos empleados son todos de naturaleza bifuncional, teniendo el mismo grupo funcional para cada centro reactivo y en su mayoría están comercializados o son fáciles de sintetizar. Ejemplos de reactivos empleados para entrecruzamiento son el glutaraldehído, el 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzeno, el hexametilendiisocianato y el ácido diazobencina-3,3'-dicarboxílico.

Hay varios métodos de inmovilización de compuestos por entrecruzamiento con reactivos polifuncionales:

- a) reacción de compuesto solamente con reactivos polifuncionales;
- b) reacción del compuesto con el reactivo polifuncional después de la adsorción de compuesto en la superficie activada de un soporte;
- c) reacción del compuesto con un soporte funcionalizado, insoluble en agua, preparado previamente por reacción del reactivo polifuncional con un polímero preformado insoluble en agua;
- d) reacción del compuesto con el reactivo polifuncional en presencia de un segundo compuesto.

El método más sencillo y usado es el primero, que implica la adición de una cantidad apropiada de un reactivo bifuncional a una disolución del compuesto a inmovilizar, en condiciones que produzca el derivado insoluble en agua. La insolubilización depende de algunos factores tales como concentración del compuesto a inmovilizar, concentración del reactivo multifuncional, pH, la fuerza iónica de la disolución, la temperatura y el tiempo de reacción.

Las propiedades físicas y químicas del compuesto inmovilizado por entrecruzamiento son similares a las del método por enlace covalente.

Ejemplos de inmovilización por entrecruzamiento son la inmovilización de aminas en el polímero estireno-divinilbenceno (199), tripsina con glutaraldehído (200 - 202), y de ribonucleasa a 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno (203).

Una ventaja de la inmovilización por entrecruzamiento es que el mismo reactivo multifuncional puede ser utilizado para preparar una gran variedad de compuestos inmovilizados. Los reactivos están comercializados o son fácilmente sintetizados. Por contra, una desventaja del método es que para determinar las condiciones óptimas, hay que asegurarse que no se producen agregados de partículas coloidales.

2.5 GENERALIDADES SOBRE LA 8-HIDROXIQUINOLINA (OXINA)

2.5.1 Introducción

La 8-hidroxiquinolina, de forma molecular C_9H_7ON , también conocida como 8-quinolinol u oxina, tiene un punto de fusión de 75-76°C y un punto de ebullición de 267°C. Es soluble en alcohol, prácticamente insoluble en agua, soluble en ácidos y álcalis. Forma complejos insolubles con metales. Las solubilidades de sus derivados varían con el pH, por lo que la oxina se utiliza ampliamente en análisis inorgánico para la determinación de Mg, Al, Zn y muchos otros metales.

La 8-hidroxiquinolina forma quelatos con iones metálicos, debido a que la estructura del grupo 8-hidroxilo permite la quelación con el nitrógeno nuclear. Tiene las reacciones típicas del fenol y de la quinolina. En sus propiedades se asemeja al α -naftol excepto por una menor actividad y alteración de productos en algunas reacciones.

2.5.2 Propiedades y reactividad

La 8-hidroxiquinolina es un reactivo versátil y forma quelatos con muchos iones metálicos, que tienen por fórmula: $M(C_9H_6NO)_n$, donde n es la valencia del ión metálico. Normalmente sólo una valencia de un elemento forma un quelato estable e insoluble. Tiene una fuerte tendencia a formar oxinatos, como por ejemplo, los formados directamente en disoluciones de cinc y cobre en nitrobencono-alcohol.

El espectro de absorción de los oxinatos de metales bivalentes muestran un desplazamiento batocrómico de la banda principal de la 8-hidroxiquinolina que es máxima para el quelato más estable, siendo los quelatos de cobalto y cromo más estables que los de aluminio, galio o indio.

En medio ácido la banda de la 8-hidroquinolina se desplaza a longitudes de onda mayores, debido a la sustitución del hidrógeno por elementos de mayor peso molecular y tamaño.

Los oxinatos se forman a través de un enlace electrovalente de oxígeno y un enlace coordinado de oxígeno y un enlace coordinado de nitrógeno. Una molécula de 8-hidroquinolina reacciona con el ión metálico para dar $M(C_9H_6NO)^{n-1}$, seguido por la reacción con otra molécula de 8-hidroquinolina para dar $M(C_9H_6NO)_2^{n-1}$; este intermedio iónico se ha identificado en disolución o se ha podido precipitar como sal básica.

El grupo $-OH$ de la 8-hidroquinolina es fuertemente activante y dirige la entrada de los sustituyentes a las posiciones orto (o-) y para (p-), es decir, a las posiciones 5 y 7, con reactivos electrofílicos, siendo generalmente la posición 5 la que se ocupa primero. Las reacciones fenólicas requieren catálisis metálicas de cloruro de cinc o aluminio.

La 8-hidroquinolina se obtiene a partir de algunos productos de transformación de la quinolina; el ión amida, fuertemente nucleofílico participa de la reacción de Chichibabin con la quinolina para dar la 2-amino-quinolina y con la isoquinolina para dar la 1-amino-quinolina. En las reacciones de sustitución electrofílica de la quinolina o isoquinolina, las posiciones 5 y 8 son las más reactivas, con C-5 un poco más reactiva en la isoquinolina y C-8 en la quinolina (204).

En la figura 5 se presentan algunos productos de transformación de la quinolina para obtención de la 8-hidroquinolina.

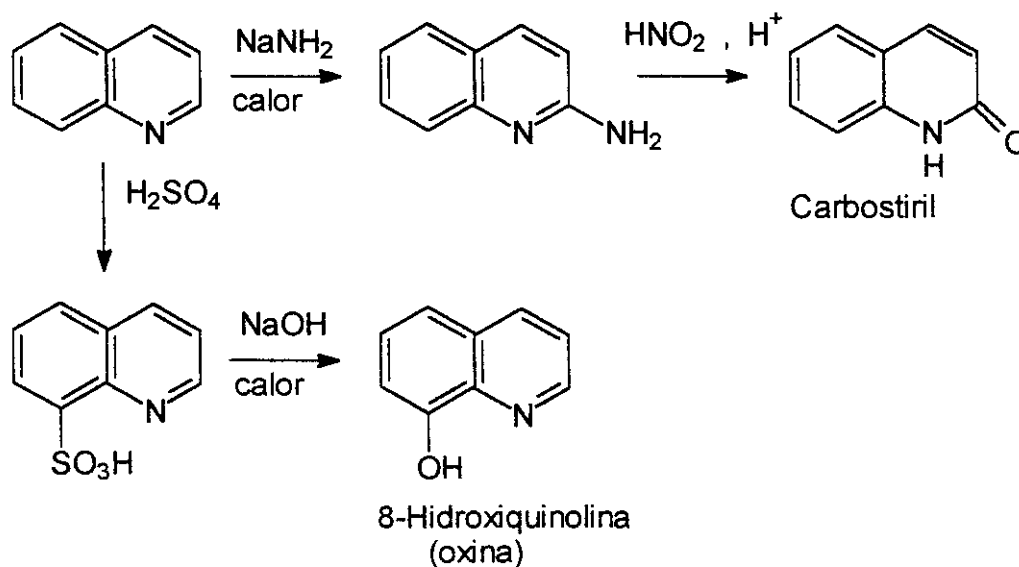


Figura 5. Algunos productos de transformación de la quinolina para obtención de la 8-hidroxiquinolina

La 8-hidroxiquinolina tiene reacciones de sustitución predominantemente en la posición 7, cuando la posición 5 está ocupada:

- En presencia de dióxido de carbono, a 150°C y a baja presión reacciona el oxinato de sodio para dar el ácido 8-hidroxiquinolina-7-carboxílico (reacción de Kolbe).
- La oxina reacciona tanto en medio ácido como en medio básico, con formaldehído y benzaldehído (condensación con aldehídos)
- La reacción de aminas secundarias, formaldehído y oxina produce 7-aminometiloxinas.

2.5.3 Aplicaciones

Dentro de las aplicaciones de 8-hidroxiquinolina se pueden destacar:

- **Fármacos:** la 8-hidroxiquinolina es un eficaz antiséptico externo y por sulfonación y yodación da el amebicida quinofón que es el ácido 7-yodo-8-hidroxiquinolina-5-sulfónico. Para el tratamiento de infecciones gastrointestinales de origen bacteriano se usa el vioform de Ciba, que es el 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina.
- **Plaguicidas:** es un fenol con propiedades fungicidas y sistémicas. Se utiliza algo en forma de sulfato (quinosol) o benzoato, para combatir fungosis en cultivos de cereales. El 8-quinolato de cobre tiene excelente poder fungicida para el tratamiento protector de textiles y pinturas. También se utiliza para la desinfección de semillas y como polvo humectable en pulverizaciones para diversos cultivos.
- **Preconcentración y separación:** se utiliza para la preconcentración de trazas de metales como, aluminio, magnesio, cadmio, cinc, cobre (204, 205). Separación por formación de pares iónicos de sulfonatos (206), separación de fenoles por intercambio de ligando (207) y separación de mezcla de metales de transición, compuestos orgánicos neutros como clorofenoles y anilinas, y también aniones inorgánicos con una fase estacionaria de adsorbosil-LC ligada a la oxina (192).
- **Determinaciones de metales como aluminio y magnesio (208).** Determinación de la concentración del ion magnesio libre en disolución acuosa, usando la 8-hidroxiquinolina inmovilizada en un adsorbente no polar, XAD-2 (209). Determinación del vanadio en agua usando extracción con 8-hidroxiquinolina y aditivos anionicos (210). Determinación de trazas de manganeso, cobre, níquel y plomo, en agua usando preconcentración con la 8-hidroxiquinolina (211).

- Formación de complejos: estudio de la afinidad para la separación de amino ácidos y proteínas basados en la formación del complejo 8-hidroxiquinolina con Pd(II) (212).

3. FINALIDAD Y PLANTEAMIENTO

En la revisión bibliográfica realizada se hace evidente que, tanto los clorofenoles como los nitrofenoles, son compuestos de gran interés analítico, debido a su amplia aplicación industrial y a su utilización como plaguicidas.

Muchos de estos fenoles son tóxicos para el hombre y los animales en bajas concentraciones, y su toxicidad es debida a su fácil adsorción por vía respiratoria, digestiva y cutánea.

La presencia de estos fenoles es consecuencia de la gran incidencia que tienen sobre numerosos aspectos de la economía moderna. Se utilizan principalmente en síntesis químicas, y algunos de ellos como el pentaclorofenol, para la conservación de la madera y como herbicida de contacto. Otros clorofenoles son productos de degradación de fenoxiacidos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético o el ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético, ampliamente utilizado como herbicida de traslocación.

En relación con los nitrofenoles, algunos de ellos, como el 2-nitrofenol y el 4-nitrofenol, son productos de degradación de plaguicidas; y otros, como el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol y el 4,6-dinitro-2-metilfenol, son las sustancias activas de dichos plaguicidas. El impacto ambiental de estos compuestos es tal, que la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera *once fenoles como contaminantes prioritarios*, y entre ellos se encuentran diversos clorofenoles y nitrofenoles. Por otro lado, la legislación Europea es cada vez más exigente en el tipo y cantidad máxima admisible de cloro- y nitrofenoles en aire, agua y alimentos.

Debido al uso de este tipo de compuestos como fungicidas y plaguicidas pueden dejar residuos en frutas, verduras y agua. La legislación de la Comunidad Europea exige que la concentración máxima de fenoles sea del orden de $\mu\text{g/L}$ en aguas y de mg/kg en frutas y verduras; esto significa que la monitorización de estos compuestos requiere técnicas selectivas y muy sensibles. Por otra parte,

dada la sensibilidad de los detectores habituales, es necesario un paso de preconcentración previo antes de la detección.

Se han aplicado diversos métodos de extracción y preconcentración de fenoles, pero la extracción y preconcentración en aguas y muestras polares sigue presentando dificultades. La extracción líquido-líquido y la extracción por destilación en corriente de vapor han sido reemplazadas por la extracción en fase sólida, ya que ofrece diversas ventajas, como tiempos de análisis más cortos, costos más bajos, volúmenes más pequeños de disolventes orgánicos y posibilidad de automatización.

Este trabajo tiene como finalidad el desarrollo de un método de preconcentración en fase sólida, basado en el empleo de una columna con oxina inmovilizada covalentemente en vidrio de poro controlado. Se evaluará la eficacia del proceso de inmovilización y preconcentración mediante espectrofotometría ultravioleta-visible o, en su defecto mediante cromatografía líquida con detección ultravioleta visible o con cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Para establecer la aplicabilidad del método se determinarán cloro- y nitrofenoles en muestras diversas en las concentraciones admitidas por la legislación.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. APARATOS Y MATERIAL

- Detector de fotodiodos integrados Hewlett Packard 8542A, conectado a un ordenador Hewlett Packard PC-AT Vectra, con una impresora Hewlett Packard Think Jet.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia con los siguientes componentes: bomba isocrática Perkin Elmer LC-250, detector espectrofotométrico UV-VIS Perkin Elmer LC-290, acoplado a una interfase PE Nelson (serie 900), ordenador IBC-Ibérica S.A. e impresora Epson LX-Junior 800.
- Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard HP 5890 (serie II), acoplado a un detector de masas HP 5989 equipado con una fuente de impacto electrónico, un sistema de tratamiento de datos Apolo serie 400 y una base de datos Willey, con una impresora Hewlett Packard Laser Jet III.
- Columna de cromatografía de gases: PTE-5 (95% Dimetil-5% Difencil-Polisiloxano).
- Columna de cromatografía líquida: Spherisorb 5 ODS(2) (150 x 4.6 mm).
- Columna de cromatografía líquida: Supercosil LC – 18 (150 x 3.0 mm).
- Bomba peristáltica de cuatro canales WIZ con una precisión de $\pm 1\%$.
- pH-metro modelo PHM 82 Standar Radiometer Copenhagen equipado con electrodo de vidrio – plata-cloruro de plata.
- Balanza analítica modelo Sartorius de 0.1 mg de sensibilidad analítica.
- Cubeta espectrofotométrica de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Jeringa de 10 μL , Hamilton.
- Jeringa de 50 μL , Unimetrics TP 5050.
- Micropipetas Brand que realizan medidas de volumen entre 0 – 25 μL y 0 – 100 μL .
- Tubos de teflón para las conducciones de 0.8 mm de diámetro interno.

- Tubos de silicona para la bomba peristáltica de 1.6 mm de diámetro interno.
- Tubos de tigon para la bomba peristáltica de 1.6 mm de diámetro interno.
- Material volumétrico de calidad contrastada.

4.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Disoluciones patrón de fenoles en medio acuoso

Se prepararon disoluciones patrón de 500 mg/L de los siguientes fenoles: 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, 2,4-dimetilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. Estas disoluciones se prepararon disolviendo 50 mg de cada fenol en 5-10 ml de NaOH 0.1 M y enrasando a 100 ml. Las concentraciones de las disoluciones de trabajo preparadas a partir de las anteriores fueron de 10, 25, 50 y 100 mg/L.

Disoluciones patrón de fenoles en disolventes orgánicos

Se prepararon disoluciones patrón de 100 mg/L de pentaclorofenol en cada uno de los siguientes disolventes orgánicos: diclorometano, n-hexano, cloroformo, tetracloruro de carbono, eter dietílico, 1,2-dicloroetano, tetrahidrofurano y tolueno. Las disoluciones se prepararon disolviendo 0.01 g de pentaclorofenol y diluyendo con el disolvente orgánico hasta 100 ml. Se prepararon disoluciones de trabajo de 10 mg/L a partir de las anteriores.

Se prepararon disoluciones patrón de 50 mg/L de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-tribromofenol y 4,4'-diclorobifenilo, disolviendo 2.5 mg de cada fenol en 50 mL de diclorometano.

Fases móviles para cromatografía líquida

- Clorofenoles:

Se prepararon fases móviles ternarias mediante la adecuada mezcla de metanol, acetonitrilo y disolución reguladora 30 mM de acetato amónico a diferentes pH (5.1, 5.2 y 5.3) para el ensayo de la fase móvil.

- Nitrofenoles:

Se prepararon fases móviles binarias mediante la adecuada mezcla de ácido fórmico 30 mM a diferentes pH (3.5, 4.0, 4.2 y 4.4) y metanol para el ensayo de la fase móvil.

Otros reactivos y disoluciones

Disolución de NaOH 0.1 M y 0.5 M.

Disoluciones de HCl 0.1 M, 0.4 M, 1 M y 2 M.

Disolución de HNO₃ al 5%.

Disolución del 10% de (aminofenil) trimetoxisilano (H₂N-C₆H₄-Si (OMe)₃ en tolueno seco.

Disolución del 2% de NaNO₂ en HCl 2 M.

Disolución de C₉H₇ON (oxina) al 2% en etanol.

Disolución de oxina 1.0×10^{-3} M en etanol.

Disolución de nitrato de hierro (III) 50 mM en ácido clorhídrico 0.1 M. Se prepararon a partir de ésta, disoluciones de concentración 10 mM, 15mM, 20 mM y 30 mM.

Disolución reguladora de HCl/NaH₂PO₄·H₂O 0.1 M de pH 2.0 y 3.0.

Disolución reguladora de CH₃COOH/CH₃COONa·3H₂O de pH 3.0.

Disolución reguladora de CH₃COOH/CH₃COONa·3H₂O de pH 4.8.

Disolución reguladora de NH₄Cl/NH₃ 1.0×10^{-3} M de pH 9.2.

Disolución de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 1.0×10^{-3} M en agua.

Vidrio de poro controlado Sigma (CPG-240) con tamaño de poro de 22.6 nm.

Disolventes: diclorometano, n-hexano, cloroformo, tetracloruro de carbono, eter dietílico, 1,2-dicloroetano, tetrahidrofurano, tolueno, acetonitrilo, metanol, etanol y acetona.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y el agua fue purificada mediante un aparato Milli-Q.

4.3. PROCEDIMIENTOS

4.3.1. Inmovilización de la 8-hidroxiquinolina (oxina) en vidrio de poro controlado (CPG)

- Lavado del vidrio de poro controlado (CPG)

En un vaso graduado se adicionan 0.5 g de CPG y 10.0 mL de ácido nítrico al 5%, se pone a hervir durante 30 minutos en una placa eléctrica, evitando proyecciones del CPG. Una vez frío, se filtra, se lava con agua Milli-Q y se deja secar en un vidrio de reloj en una estufa a 95°C durante toda la noche.

- Inmovilización de la 8-hidroxiquinolina (oxina)

En un matraz de fondo redondo se coloca el CPG una vez lavado, se añaden 5.0 mL de la disolución de (aminofenil) trimetoxisilano al 10% y se deja a reflujo durante 4 horas. A continuación se filtra el precipitado de arilamina unida al CPG (arilamina-CPG) de color violeta-morado y se deja secar en una estufa a 80°C durante toda la noche.

Para diazotar el compuesto se coloca la arilamina-CPG en un vaso de precipitados y se adicionan 25.0 mL de la disolución del 2% de NaNO₂ en HCl 2 M. La mezcla de reacción se deja durante 30 minutos en baño de hielo, para formar la sal de diazonio-CPG de color marrón. Se filtra rápidamente y se lava con tres porciones de agua fría.

Se coloca la sal de diazonio-CPG en un vaso de precipitados y se adicionan 25.0 mL de la disolución de oxina al 2% en etanol. La reacción de formación del azocompuesto unido a la oxina tarda en completarse 30 minutos. El producto de la reacción es de color rojo-morado. A continuación se filtra la oxina inmovilizada en CPG y se lava con etanol. Se recoge las aguas de lavado con etanol para calcular el rendimiento del proceso de inmovilización por diferencia. Después se lava la oxina inmovilizada con HCl 0.1 M y agua Milli-Q. Se coloca el compuesto obtenido en una estufa a 95°C durante 4 horas y se conserva en un desecador.

- Preparación y conservación de la columna de vidrio

Se pone lana de vidrio en uno de los extremos de la columna de vidrio para evitar la salida de la oxina inmovilizada. Se coloca en un vaso una porción de la oxina inmovilizada y HCl 0.1 M. La columna se rellena bombeando continuamente la suspensión de la oxina inmovilizada, a través de un tubo de silicona conectado a una bomba peristáltica. Se pone lana de vidrio en el otro extremo de la columna y se conecta a través de tubos de teflón al resto del sistema de preconcentración. La columna rellena de oxina inmovilizada en CPG (10 mm x 2.5 mm, 20 mm x 2.5 mm o 30 mm x 2.5 mm) se almacena a 4°C en una disolución de HCl 0.1 M (pH 1.0) para evitar la hidrólisis de la oxina.

4.3.2. Determinación de la eficacia de la inmovilización oxina-CPG por formación de oxinato de aluminio con detección espectrofotométrica

- Preparación del calibrado de oxina en etanol

En matraces aforados de 10.0 mL se añaden entre 1.0 y 4.0 mL de una disolución de oxina en etanol 1.0×10^{-3} M. En cada matraz se añade 1.0 mL de disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 1.0×10^{-3} M de pH 9.2, 5.0 mL de la disolución de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 1.0×10^{-3} M y se enrasa con agua, midiéndose su absorbancia a 360 nm frente a un blanco preparado en las mismas condiciones en ausencia de oxina.

- Determinación de oxina en las aguas de lavado con etanol resultante del proceso de inmovilización

Se mide el volumen de las aguas de lavado, se recogen 5.0 mL y se enrasa con agua a 100 mL. En matraces aforados de 10.0 mL se añaden entre 1.0 y 4.0 mL de esta disolución. En cada matraz se añade 1.0 mL de disolución reguladora $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 1.0×10^{-3} M de pH 9.2, 5.0 mL de la disolución de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 1.0×10^{-3} M y se enrasa con agua. El ensayo se realiza por cuadruplicado y

se determina la concentración con el calibrado obtenido anteriormente. El rendimiento de la inmovilización se calcula por diferencia con la cantidad añadida.

4.3.3. Determinación de fenoles con detección espectrofotométrica

La determinación espectrofotométrica de fenoles se realiza en todos los casos por comparación con la correspondiente línea de calibrado que se prepara en cada caso como se indica a continuación:

- Preparación de los calibrados de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol, clorofenol, fenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-dimetilfenol a pH 1.0 en medio acuoso

Se utilizaron disoluciones que contienen entre 0.2, y 9.0 mL respectivamente de las disoluciones de 25 mg/L de cada fenol y se ajustaron a pH 1.0, se llevaron a un volumen de 25.0 mL y a continuación se midió la absorbancia del máximo de la banda de cada fenol frente a un blanco preparado en las mismas condiciones en ausencia del fenol. La absorbancia de los distintos fenoles se midieron a las siguientes longitudes de onda: pentaclorofenol a 302 nm, 2,4,6-triclorofenol a 290 nm, 2,4-diclorofenol a 286 nm, 2-clorofenol a 276 nm, fenol a 270 nm, 4,6-dinitro-2-metilfenol a 272 nm, 2,4-dinitrofenol a 264 nm, 2-nitrofenol a 350 nm, 4-nitrofenol a 320 nm, 4-cloro-3-metilfenol a 280 nm y 2,4-dimetilfenol a 278 nm.

- Preparación de los calibrados de pentaclorofenol a pH 2.0, 3.0 y 4.8 en medio acuoso

Se utilizaron disoluciones que contienen entre un 1.0 y 9.0 mL de las disoluciones de 25 mg/L de pentaclorofenol y se ajustaron a pH 2.0, 3.0 y 4.8, se llevaron a un volumen de 25.0 mL y a continuación se midió la absorbancia del pentaclorofenol a 302 nm en las distintas disoluciones frente a un blanco preparado en las mismas condiciones en ausencia del pentaclorofenol.

- Preparación de los calibrados de 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 en acetonitrilo

En matraces aforados de 10.0 mL se añaden entre 0.1 y 0.9 mL respectivamente de las disoluciones de 100 mg/L de cada fenol y se enrasan con acetonitrilo. A continuación se miden las absorbancias del máximo de las bandas de cada fenol usando el acetonitrilo como blanco. La absorbancia de los distintos fenoles fue medida en las siguientes longitudes de onda: pentaclorofenol a 302 nm, 2,4,6-triclorofenol a 290 nm, 2,4-diclorofenol a 292 nm, clorofenol a 278 nm, fenol a 272 nm, 4,6-dinitro-2-metilfenol a 272 nm, 2,4-dinitrofenol a 264 nm, 2-nitrofenol a 350 nm, 4-nitrofenol a 320 nm, 4-cloro-3-metilfenol a 284 nm y 2,4-dimetilfenol a 282 nm.

4.3.4. Determinación de la retención y elución de los fenoles a diferentes pHs y caudales con detección espectrofotométrica

Se pasan por una columna rellena de oxina inmovilizada en CPG (10 mm x 2.5 mm), 10.0 mL de acetonitrilo y 10.0 mL de HCl 0.1 M. A continuación se pasan las disoluciones acuosas de fenoles de concentraciones entre 3.0 y 10 mg/L, a pHs 1.0, 2.0, 3.0 y 4.8, con distintos caudales entre 0.4 y 1.8 mL/min. A continuación se eluye el fenol con acetonitrilo puro y mezcla de acetonitrilo puro y agua. El proceso de la retención y elución se evalúan espectrofotométricamente.

Para el estudio de la influencia del caudal se pasan 10.0 mL de disoluciones acuosas a pH 1.0 de los distintos fenoles en concentraciones del orden de 10 mg/L a caudales de 1.0 mL/min ó 0.6 mL/min. A continuación se eluye con 10.0 mL de acetonitrilo a caudales de 1.0 mL/min o 0.6 mL/min. El rendimiento del proceso de retención y elución de los fenoles se realiza espectrofotométricamente, midiéndose la absorbancia a la longitud de onda máxima frente a un blanco en ausencia de fenol y determinando su concentración

a partir de los calibrados del apartado 4.3.3. Entre los diferentes ensayos se lava la columna con 10.0 mL de acetonitrilo y 10.0 mL de HCl 0.1 M.

El estudio de la retención y elución de pentaclorofenol con disolventes orgánicos se lleva a cabo bombeando 10.0 mL de la disolución de pentaclorofenol del orden de 10 mg/L a un caudal de 1.0 mL/min. A continuación se eluye con acetonitrilo a un caudal de 0.6 mL/min. El proceso de la retención y elución se evalúan espectrofotométricamente, usando el disolvente orgánico como blanco. Se realizan experimentos del mismo tipo con cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,2-dicloroetano saturado con HCl 0.1 M.

4.3.5. Determinación de clorofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La determinación cromatográfica se realiza por el procedimiento del patrón externo para lo cual se prepararon calibrados de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol a partir de la disolución patrón de 500 mg/L en medio acuoso. Se preparan mezclas de clorofenoles que contienen concentraciones entre 1.5 – 4.5 mg/L de pentaclorofenol, 0.5 – 3.5 mg/L de 2,4,6-triclorofenol y 1.0 – 5.0 mg/L de 2,4-diclorofenol y se enrasa con metanol hasta 10.0 mL. Se inyectan 20 μ L de las mezclas de clorofenoles en una fase móvil metanol: acetonitrilo: 30 mM acetato amónico (35:25:40), a un caudal de 1.0 mL/min y la separación se lleva a cabo con una columna Spherisorb 5 ODS y la detección a 240 nm.

Se prepararon también calibrados de pentaclorofenol en medio acuoso de disoluciones con concentraciones entre 0.07 – 8.0 mg/L, usando la misma fase móvil y caudal, y la separación se lleva a cabo con una columna Supercosil LC – 18.

4.3.6. Preconcentración selectiva de clorofenoles y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El proceso de retención y elución es el desarrollado en 4.3.4. con mezclas de clorofenoles con concentraciones entre 1.0 – 6.0 mg/L de pentaclorofenol, 2.0 – 7.0 mg/L de 2,4,6-triclorofenol y 1.0 – 6.0 mg/L de 2,4-diclorofenol y se sigue la cantidad de cada clorofenol no retenida y eluida cromatográficamente según el procedimiento descrito en 4.3.5.

4.3.7. Determinación de nitrofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La determinación cromatográfica se realiza por el procedimiento del patrón externo para lo cual se prepararon calibrados de los nitrofenoles 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol a partir de las disoluciones patrón de 500 mg/L en medio acuoso. Se prepararon calibrados de cada nitrofenol, en función de la sensibilidad de cada uno, que contenían concentraciones entre 0.1 y 1.5 mg/L de 2-nitrofenol, 0.05 y 1.0 mg/L de 4,6-dinitro-2-metilfenol y 0.3 y 1.0 mg/L de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. Se inyectaron 20 μ L de cada nitrofenol en una fase móvil metanol: ácido fórmico 30 mM a pH 4.2 (65:35), a un caudal de 1.0 mL/min y la separación se llevó a cabo con una columna Spherisorb 5 ODS y la detección a 350 nm.

4.3.8. Preconcentración selectiva de nitrofenoles y determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

4.3.8.1 Procedimiento para el 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol

El proceso de preconcentración se realiza de la siguiente forma: se pasan por la columna de vidrio rellena de oxina inmovilizada en CPG (10 mm x 2.5 mm), 5.0 mL de HCl 0.4 M y después 10.0 mL de disolución de nitrato de hierro (III) 20 mM en HCl 0.1 M. A continuación se pasan 10.0 mL de una mezcla de los dos nitrofenoles en concentraciones del orden de 1.6 mg/L, a un caudal de 0.6 mL/min. A continuación se eluye con 10.0 mL de la fase móvil (65% MeOH, 35% HCOOH/NaCOOH 30 mM a pH 4.2), a un caudal de 1.0 mL/min y se analiza por HPLC según el procedimiento descrito en 4.3.7.

4.3.8.2 Procedimiento para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol

Para la preconcentración de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol se pasan por la columna de vidrio rellena de oxina inmovilizada en CPG (10 mm x 2.5 mm) 10.0 mL de disolución de nitrato de hierro (III) 20 mM en HCl 0.1 M. A continuación se pasan 10.0 mL de la disolución de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en concentración del orden de 1.6 mg/L, a un caudal de 1.0 mL/min. La elución y la separación por HPLC se hace de acuerdo con el procedimiento descrito en 4.3.8.1.

4.3.9. Determinación de clorofenoles por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

La determinación se realiza utilizando como patrón interno el 2,4,6-tribromofenol. Se prepararon mezclas de clorofenoles que contienen concentraciones entre 7.0 - 15 mg/L de pentaclorofenol, 1.0 - 5.0 mg/L de 2,4,6-triclorofenol y 5.0 - 12 mg/L de 2,4-diclorofenol y se enrasan con HCl 1 M hasta 10.0 mL. Las mezclas de los clorofenoles en HCl 1 M, se extraen 3 veces con 2.5 mL de diclorometano. El extracto se filtra previamente sobre lana de vidrio y Na₂SO₄ anhidro. A continuación se adiciona el patrón interno y se enrasa con diclorometano a 10.0 mL. Se inyectan 3.0 µL de las mezclas de clorofenoles en el cromatógrafo en modo sin división durante 2 minutos, siendo la temperatura inicial de 40°C y gradiente de temperatura hasta 70°C durante 1 minuto y seguidamente a 20°C/min, hasta 230°C durante 5 minutos. La temperatura del inyector es de 300°C y la del detector de 250°C, utilizando helio como gas portador.

4.3.10. Preconcentración selectiva de clorofenoles y determinación por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

A partir de la disolución de trabajo de 50 mg/L, se prepararon mezclas de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol que contenían cantidades comprendidas entre 30 – 90 µg a pH 1.0. Se pasan por columnas de vidrio rellenas con oxina inmovilizada en CPG de 10 mm, 20 mm y 30 mm, 10.0 mL de la mezcla de clorofenoles a un caudal de 0.6 mL/min. A continuación se eluye con diclorometano a un caudal de 0.6 mL/min, se añaden 120 µg de patrón interno y se lleva a un volumen de 10.0 mL. El estudio de la recuperación de los clorofenoles se realiza utilizando el procedimiento descrito en 4.3.9.

4.3.11. Determinación de pentaclorofenol en madera de pino (serrín)

Se pesa 1.0 g de serrín, se añaden 10.0 mL de la disolución de NaOH 0.5 M y se adicionan diferentes cantidades de pentaclorofenol cada vez, agitando unos minutos. Después de un máximo de 24 horas, se filtra con un filtro de papel y se lava con dos porciones de 1.0 mL cada una de NaOH 0.5 M. Una vez filtrado se añaden 3.0 mL de HCl 2 M para asegurar el pH ácido y se vuelve a filtrar en papel para obtener un filtrado limpio.

A continuación se pasan entre 10.0 y 12.0 mL de la muestra por la columna rellena de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG), a un caudal de 1.0 mL/min. A continuación se eluye con 1.0 mL de acetonitrilo. La cuantificación se realiza utilizando el calibrado descrito en 4.3.5.

4.3.12. Determinación de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (dinoseb) en zumo de limón

Se filtran 10.0 mL de zumo de limón utilizando un filtro de pliegues a un matraz. A continuación se añaden en un matraz de 10.0 mL, 1.0 mL de ácido clorhídrico 1 M, 2 µg de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol y se enrasa hasta 10.0 mL con el zumo de limón previamente filtrado. Se agita fuertemente la disolución y se filtra mediante una membrana de nailon de 0.45 µm.

La muestra de limón se pasa por la columna rellena de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG), a un caudal de 1.0 mL/min. A continuación se eluye con la fase móvil (65% MeOH, 35% HCOOH/NaCOOH 30 mM a pH 4.2), recogiendo dos alícuotas de 1.0 mL y se cuantifican por HPLC empleando el calibrado descrito en 4.3.7.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE LA INMOVILIZACIÓN OXINA-CPG POR FORMACIÓN DE OXINATO DE ALUMINIO CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

5.1.1. Calibrado de la oxina

La determinación de la cantidad de oxina inmovilizada en CPG se realizó según el procedimiento descrito en 4.3.2. El máximo de absorción del oxinato de aluminio es a 360 nm, longitud de onda a la que se realiza el calibrado, los resultados se presentan en la tabla 8 y en la figura 6.

Tabla 8. Variación de la absorbancia del oxinato de aluminio con la concentración de oxina

Disolución reguladora: pH 9.2

Disolvente: etanol/H₂O

Concentración Al(NO₃)₃ 9H₂O = 1.0 × 10⁻³ M

Longitud de onda: 360 nm

Absorbancia	Concentración, M
0.2022	1.0 × 10 ⁻⁴
0.3977	2.0 × 10 ⁻⁴
0.6120	3.0 × 10 ⁻⁴
0.7844	4.0 × 10 ⁻⁴

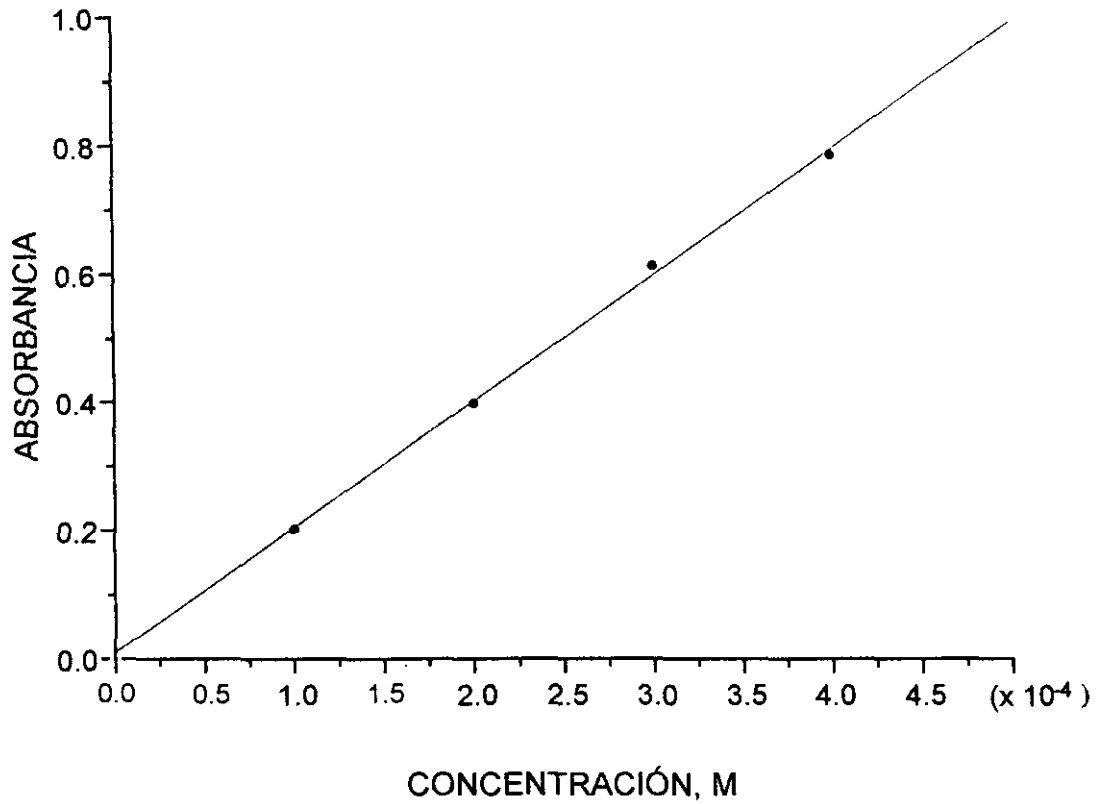


Figura 6. Variación de la absorbanza de oxinato de aluminio con la concentración de oxina

Recta de regresión: $A = 1960 C + 0.0088$

Coefficiente de correlación (r) = 0.9991

5.1.2. Eficacia de la inmovilización de la oxina-CPG

Con el objetivo de determinar la cantidad de oxina inmovilizada en CPG, se recogen las aguas de lavado con etanol y se determina la concentración por formación de oxinato de aluminio y medida espectrofotométrica a 360 nm, usando el calibrado del apartado 5.1.1.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para cuatro alícuotas preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito en 4.3.2.

Tabla 9. Determinación de la concentración de oxina por formación de oxinato de aluminio en las aguas de lavado con etanol de la oxina inmovilizada en CPG

Disolución reguladora: pH 9.2

Disolvente: etanol/H₂O

Concentración: Al(NO₃)₃ · 9H₂O = 1.0 × 10⁻³ M

Longitud de onda: 360 nm

Alícuota	V, mL	Concentración, M	Absorbancia
1	1.0	6.48 × 10 ⁻⁵	0.1290
2	2.0	1.30 × 10 ⁻⁴	0.2598
3	3.0	1.89 × 10 ⁻⁴	0.3779
4	4.0	2.66 × 10 ⁻⁴	0.5298

Se utilizó la alícuota 2 para hacer los cálculos de la eficacia de la inmovilización, considerando el calibrado de la figura 6. Teniendo en cuenta las diluciones requeridas 5:100 y 2:10, la concentración de oxina libre en disolución es de 2.6 × 10⁻² M que corresponde a 0.4340 g de oxina. Dado que la cantidad de oxina adicionada fue de 0.5002 g, la cantidad de oxina inmovilizada calculada por

diferencia fue de 0.0662 g de oxina en 0.4745 g de CPG. Por tanto los mg de oxina inmovilizados por gramo de CPG son:

$$66.2 \text{ mg}/0.4745 \text{ g} = 139.5 \text{ mg de oxina/g de CPG}$$

En la tabla 10 se presenta los resultados obtenidos para diferentes inmovilizaciones, donde se muestran las cantidades en gramos de vidrio de poro controlado (CPG), de la oxina adicionada y de la oxina no inmovilizada. A partir de estos datos se calcula la cantidad de oxina inmovilizada en miligramos por gramos de CPG.

Tabla 10. Resultados obtenidos en diferentes inmovilizaciones

Inmovilización	CPG, g	Oxina adicionada, g	Oxina no inmovilizada, g	Oxina inmovilizada, mg/g CPG
1	0.5000	0.5006	0.4500	101
2	0.5009	0.5004	0.4448	111
3	0.5003	0.5000	0.4211	157
4	0.4745	0.5002	0.4340	140

5.1.3. Estabilidad de la oxina-CPG en ausencia de fenoles

La oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG) se seca a 95°C y se conserva en un desecador. No se ha observado una gran pérdida de su reactividad para retener los diferentes fenoles después de cinco meses, pues una columna rellena con esta oxina retuvo 88.2% cuando se pasaron 10.0 mL de pentaclorofenol de 10 mg/L de concentración, a un caudal de 1.0 mL/min, considerando que la retención inicial fue de 91.0%.

5.2. ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DIFERENTES FENOLES CLORADOS, NITRADOS Y METILADOS

5.2.1. Calibrados de los fenoles en medio acuoso a pH 1.0

De acuerdo con los procedimientos del apartado 4.3.3., se prepararon disoluciones de concentración entre 0.2 y 9.0 mg/L de los diferentes fenoles en medio acuoso a pH 1.0 y se realizaron los calibrados de la absorbancia frente a concentración, a la longitud de onda máxima de cada fenol. En la tabla 11, se presentan las rectas de regresión y el coeficiente de correlación (r) de cada fenol. En todos los casos las ordenadas en el origen no son muy diferentes de cero. Se observan valores de los coeficientes de correlación iguales o superiores a 0.9947.

Tabla 11. Recta de regresión y coeficiente de correlación (r) de diferentes fenoles en medio acuoso a pH 1.0.

Fenoles	Recta de regresión, A = B C + D	Coficiente de correlación, r	λ máx., nm
Pentaclorofenol	A = 0.0080 C - 0.0026	0.9947	302
2,4,6-Triclorofenol	A = 0.0090 C + 0.0034	0.9954	290
2,4-Diclorofenol	A = 0.0113 C + 0.0054	0.9956	286
2-Clorofenol	A = 0.0177 C + 0.0038	0.9997	276
Fenol	A = 0.0144 C + 0.0029	0.9995	270
4,6-Dinitro-2-metilfenol	A = 0.0727 C - 0.0024	0.9999	272
2,4-Dinitrofenol	A = 0.0624 C - 0.0024	0.9998	264
2-Nitrofenol	A = 0.0225 C - 0.0013	0.9998	350
4-Nitrofenol	A = 0.0715 C + 0.0022	0.9999	320
4-Cloro-3-metilfenol	A = 0.0082 C - 0.0011	0.9961	280
2,4-Dimetilfenol	A = 0.0203 C - 0.0002	0.9993	278

Recta de regresión: $A = B C + D$

Donde: A = Absorbancia

B = Pendiente

C = Concentración, mg/L

D = Ordenada en el origen

5.2.2. Calibrados de los fenoles en acetonitrilo

Se realizan en base a los procedimientos descritos en 4.3.3., preparándose disoluciones con concentraciones entre 1.0 y 9.0 mg/L de los diferentes fenoles en acetonitrilo y se realizaron los calibrados de la absorbancia frente a concentración en el máximo de absorción de cada fenol. Sin embargo, solamente presentó interés la variación de la absorbancia con la concentración para el 2-nitrofenol, con recta de regresión: $A = 0.0143 C + 0.0120$ y coeficiente de correlación (r) 0.9993.

Con relación a los otros fenoles no se pueden determinar en las concentraciones que se eluían, probablemente porque la absorción del disolvente es tan alta que no se puede restar adecuadamente el blanco.

5.3. ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA RETENCIÓN Y ELUCIÓN DE FENOLES CLORADOS, NITRADOS Y METILADOS

Para la retención se prepararon disoluciones acuosas de los distintos fenoles de 10 mg/L de concentración en medio acuoso a pH 1.0. De acuerdo con el apartado 4.3.4. se pasaron a través de la columna con oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG) 10.0 mL de la disolución de 10 mg/L de cada fenol y se recogieron 10.0 mL de la disolución de desecho. Se midió la absorbancia máxima de cada fenol en la disolución de 10 mg/L antes de pasar por la columna y después en la disolución de desecho. Aplicando los calibrados descritos en el apartado 5.2.1., se calcula el porcentaje de retención de los distintos fenoles. En la tabla 12 se presentan los porcentajes de retención para los fenoles estudiados a los caudales de 1.0 mL/min y 0.6 mL/min.

Tabla 12. Estudio de la retención de los fenoles clorados, nitrados y metilados en oxina - CPG.

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Concentración = 10 mg/L , pH 1.0

$V_i = V_f = 10.0$ mL

Fenoles	λ máx., nm	Retención*, % 1.0 mL/min	S_{n-1}	Retención*, % 0.6 mL/min	S_{n-1}
Pentaclorofenol	302	91.0	2.2	98.8	1.7
2,4,6-Triclorofenol	290	61.6	3.3	73.2	1.2
2,4-Diclorofenol	286	39.2	5.4	42.1	0.3
2-Clorofenol	276	26.5	3.5	30.2	2.7
Fenol	270	7.3	1.4	9.1	0.5
4,6-Dinitro-2-metilfenol	272	36.4	1.5	40.8	1.2
2,4-Dinitrofenol	264	15.5	0.2	20.2	1.4
2-Nitrofenol	350	42.0	2.5	45.3	4.0
4-Nitrofenol	320	6.4	0.3	10.9	0.1
4-Cloro-3-metilfenol	280	38.0	2.1	46.0	5.2
2,4-Dimetilfenol	278	17.1	0.3	23.8	1.7

* media de 3 experimentos

Como se puede observar en los resultados presentados en la tabla 12, de los clorofenoles estudiados los que más se retienen son el pentaclorofenol, 98.8%, y el 2,4,6-triclorofenol, 73.2%, a un caudal de 0.6 mL/min. Con relación a los nitrofenoles el que tiene mayor retención es el 2-nitrofenol, 45.3%, a un caudal de 0.6 mL/min. De los fenoles metilados la mayor retención observada fue para el 4-cloro-3-metilfenol 46.0% a un caudal de 0.6 mL/min.

De acuerdo con este estudio, no se pueden calcular las recuperaciones, sino solo las retenciones, dado que no es posible evaluar la cantidad que se ha eluido, con excepción del 2-nitrofenol.

Los espectros de absorción UV-VIS de las disoluciones patrón de fenoles de 10 mg/L de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2-nitrofenol y 4-cloro-3-metilfenol se muestran en las figuras 7 a 10.

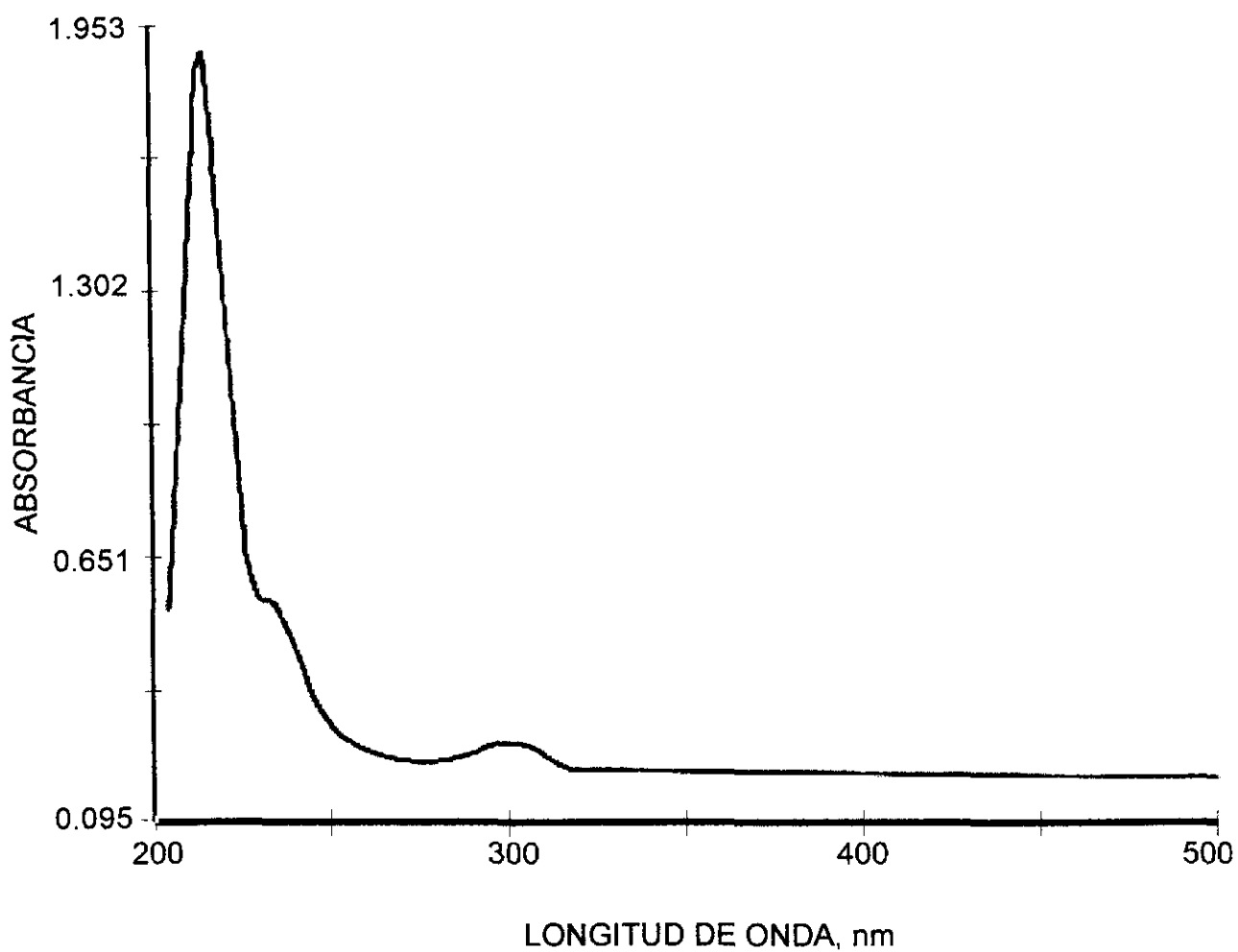


Figura 7. Espectro de absorción de la disolución patrón del pentaclorofenol.

Concentración = 10 mg/L, pH 1.0

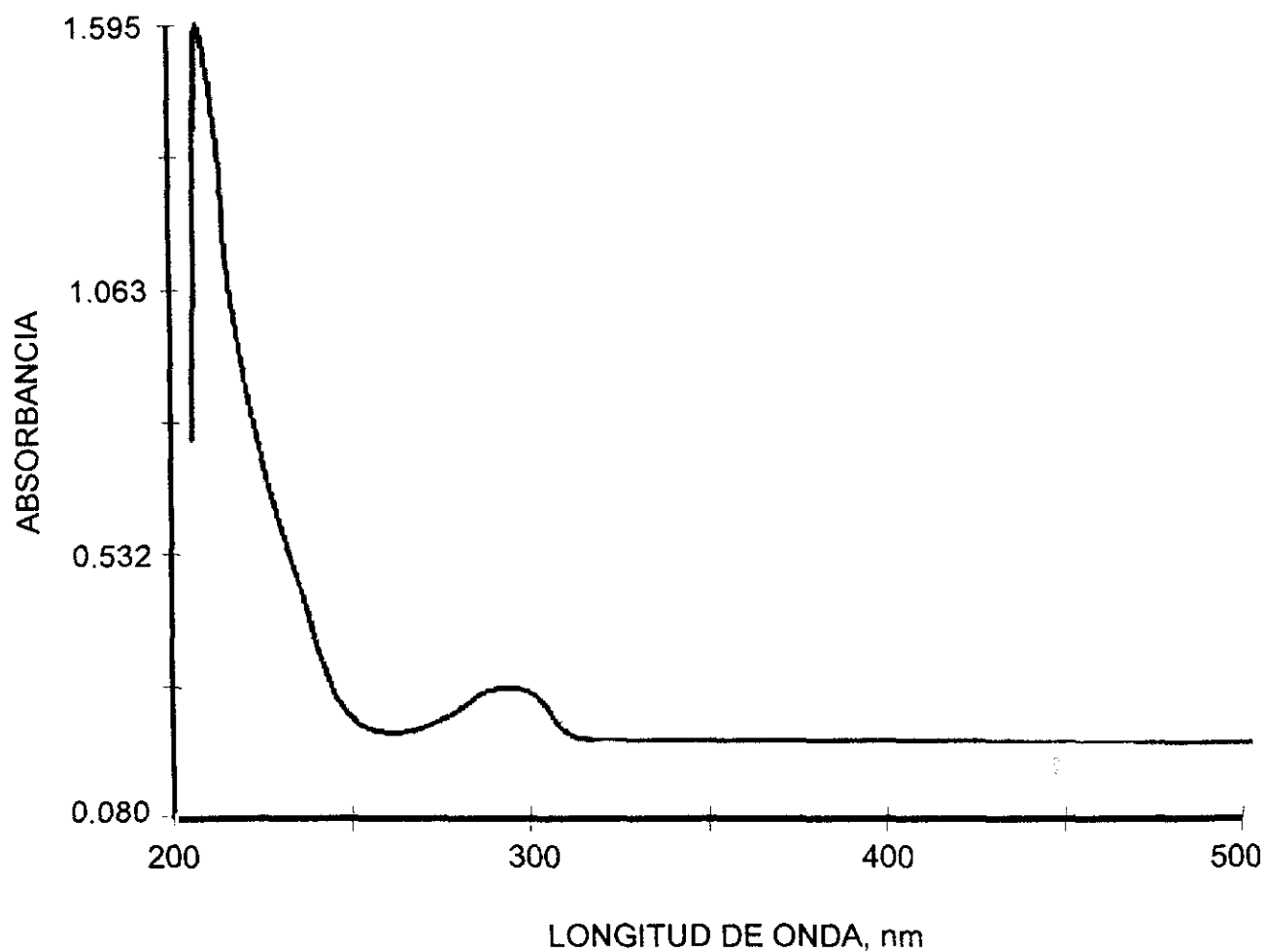


Figura 8. Espectro de absorción de la disolución patrón de 2,4,6-triclorofenol.
Concentración = 10 mg/L, pH 1.0

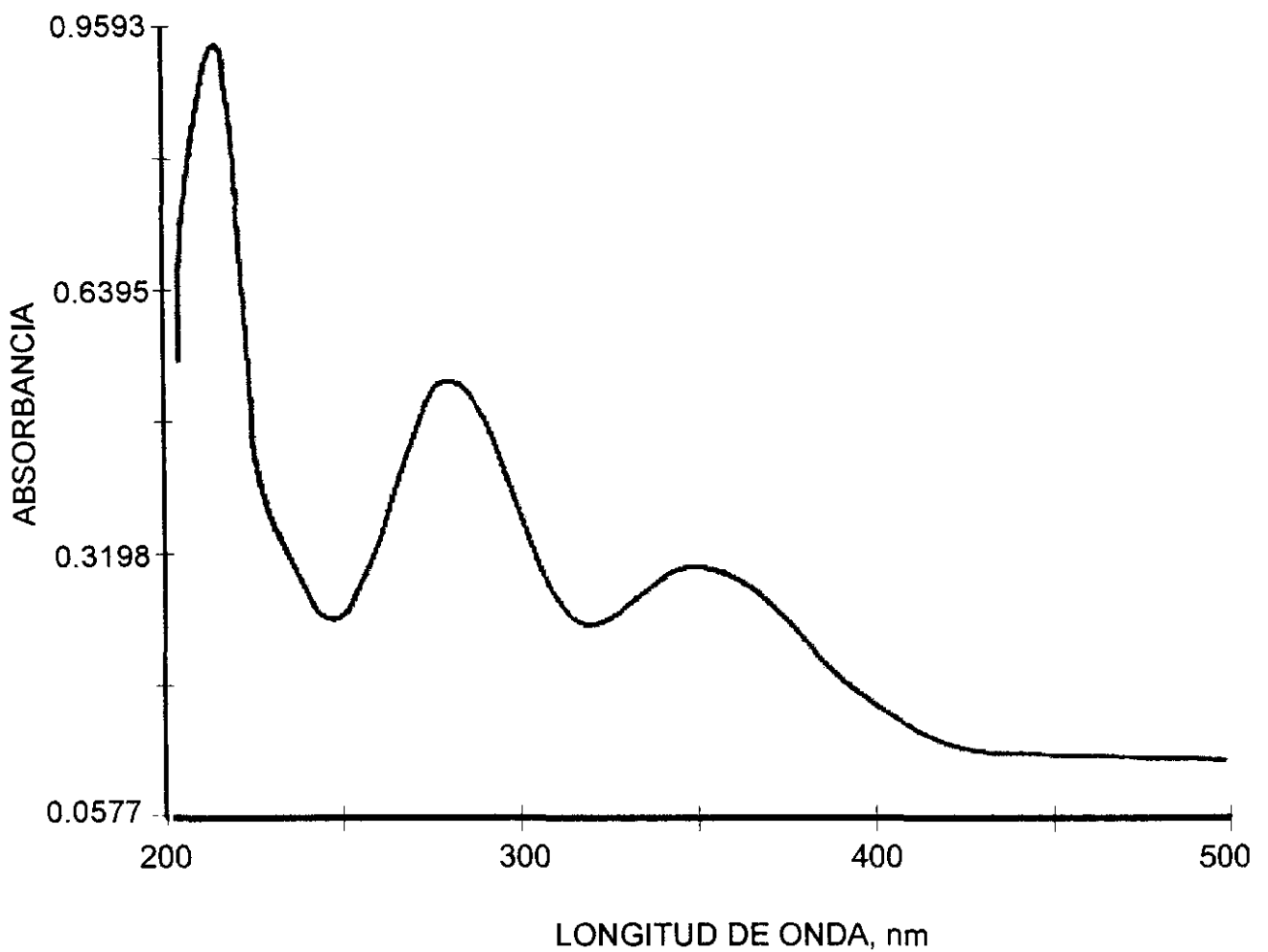


Figura 9. Espectro de absorción de la disolución patrón de 2-nitrofenol.

Concentración = 10 mg/L, pH 1.0

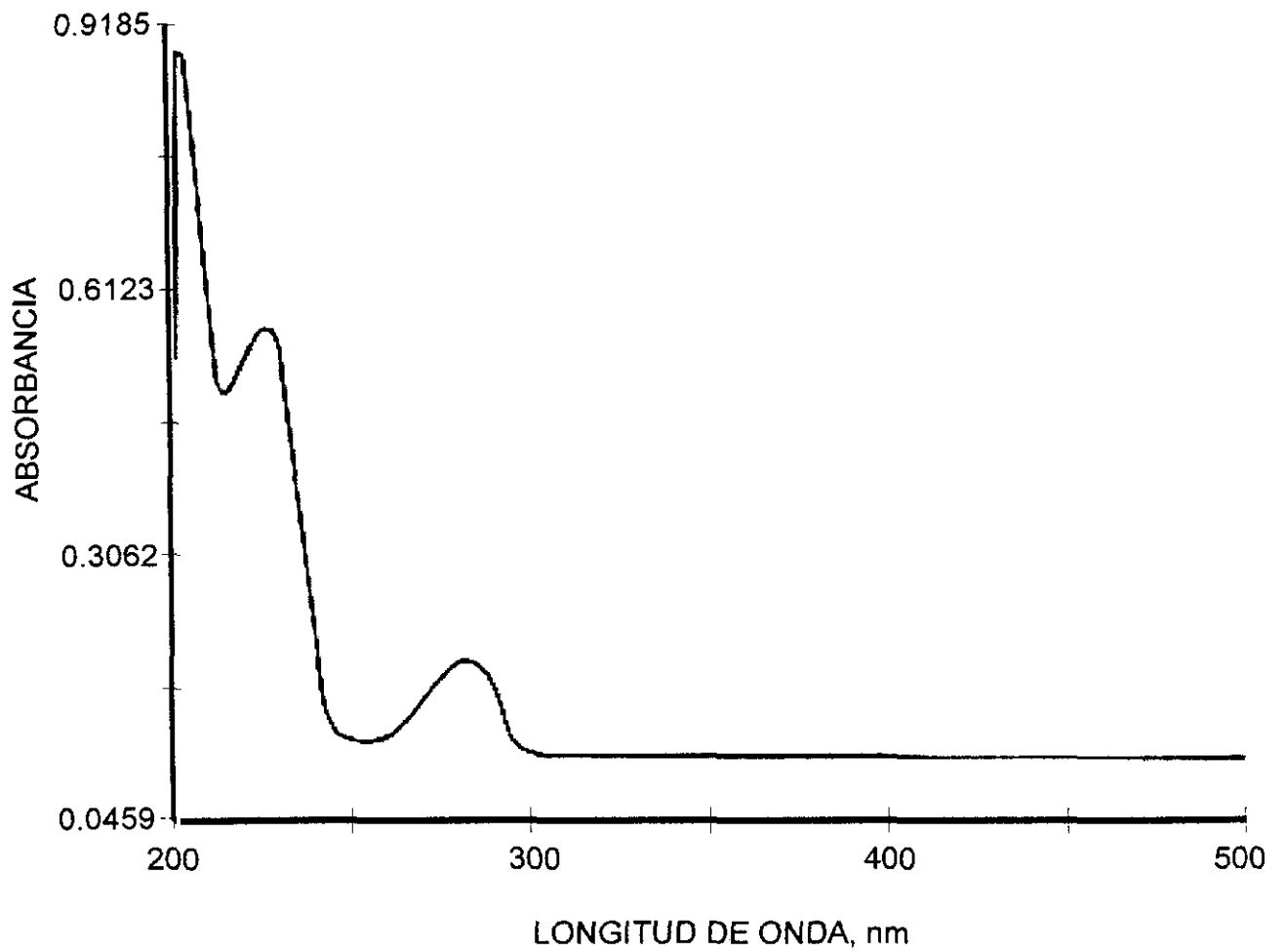


Figura 10. Espectro de absorción de la disolución patrón de 4-cloro-3-metilfenol.
Concentración = 10 mg/L, pH 1.0

La elución de los distintos fenoles se realizó siguiendo el procedimiento descrito en 4.3.4., con 10.0 mL de acetonitrilo. Se recogieron 10.0 mL de la disolución de desecho y se midió la absorbancia máxima. Se hicieron cálculos de elución para el 2-nitrofenol; para el resto no fue posible pues los fenoles tienen el máximo de absorción en el entorno del disolvente y los resultados obtenidos fueron poco representativos.

De acuerdo con el calibrado del apartado 5.2.2., la elución del 2-nitrofenol fue de 34.7% a un caudal de 1.0 mL/min y de 39.5% a un caudal de 0.6 mL/min. Si bien, a 350 nm la sensibilidad en estas condiciones también es pequeña.

Los espectros de absorción UV-VIS del 2-nitrofenol eluido con acetonitrilo a caudales de 1.0 mL/min y 0.6 mL/min se presentan en las figuras 11 y 12.

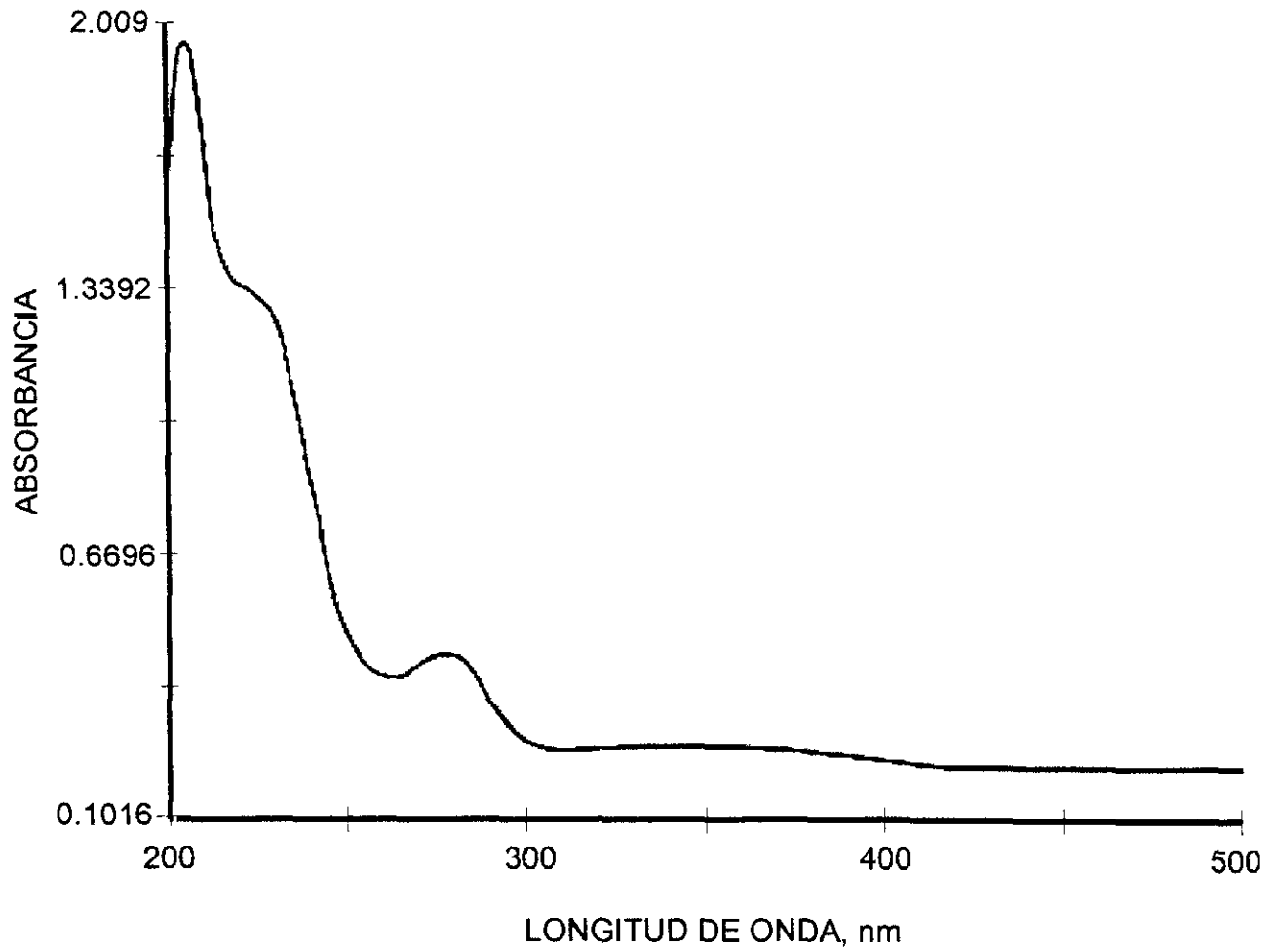


Figura 11. Espectro de absorción del 2-nitrofenol eluido con acetonitrilo.
Caudal = 1.0 mL/min.

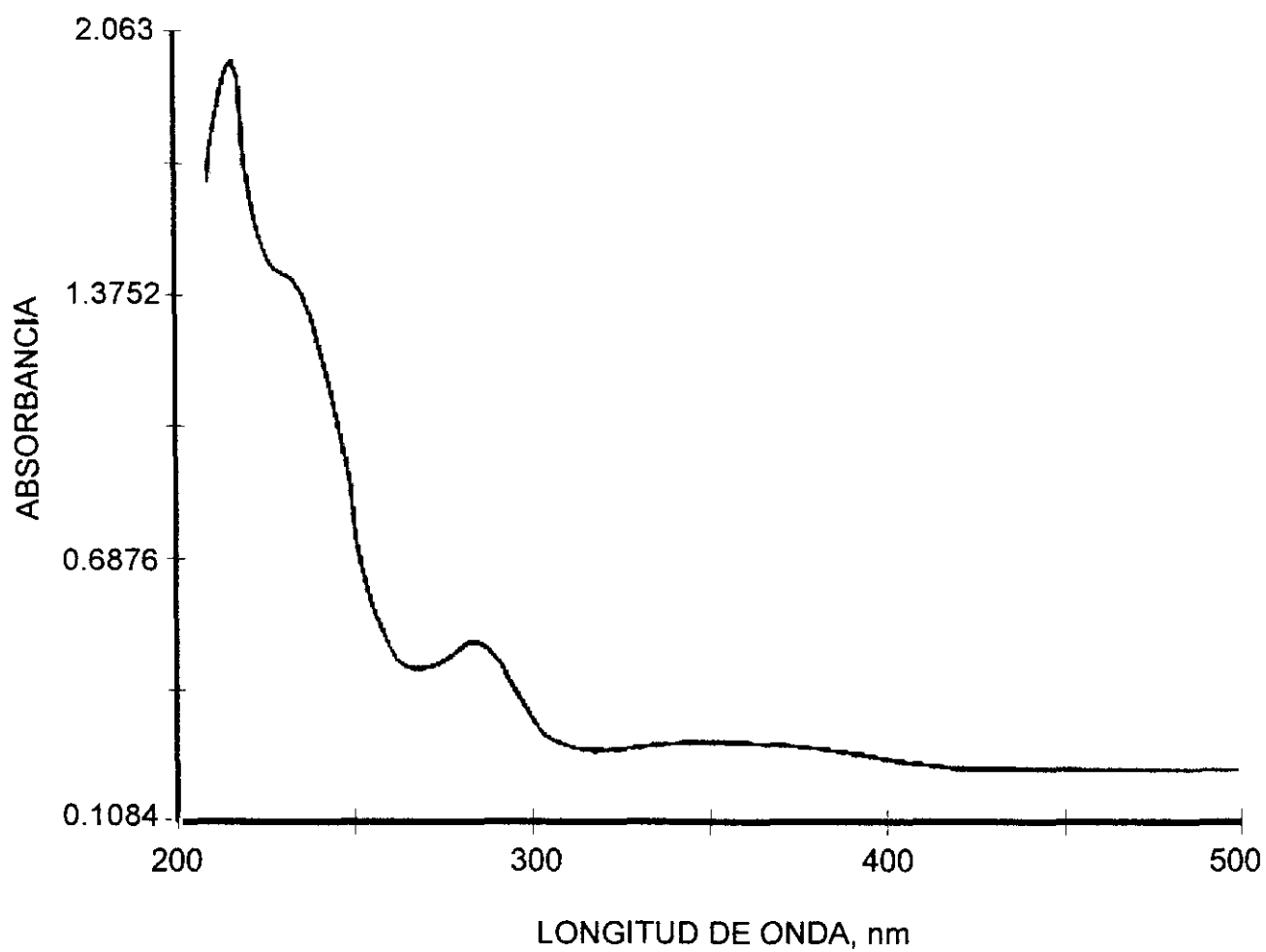


Figura 12. Espectro de absorción del 2-nitrofenol eluido con acetonitrilo.
Caudal = 0.6 mL/min.

La elución de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol y de los nitrofenoles no ha podido ser estudiada por absorción UV-VIS, debido a las irreproducibilidades obtenidas al tener el máximo de absorción en la zona de absorción del disolvente.

5.4. OPTIMIZACIÓN DE LA RETENCIÓN Y ELUCIÓN DE LOS FENOLES

Con relación a la retención y elución de los fenoles influyen factores químicos e hidrodinámicos, por lo cual ha sido necesaria la optimización de diversos parámetros tales como pH, naturaleza de los fenoles y del eluyente.

5.4.1. Influencia del pH en la retención y elución de los fenoles

De acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.4., para el pentaclorofenol y de acuerdo con los resultados de la tabla 13, se observa que la retención disminuye al aumentar el pH y es máxima a pH 1.0. Por lo que es de esperar que las formas más protonadas de fenol sean las que retengan mejor y al mismo tiempo se evita la hidrólisis del compuesto oxina – CPG.

Respecto a la elución los mejores resultados fueron los obtenidos con acetonitrilo sin que sea necesario control de pH.

En la tabla 13 se presenta el porcentaje de retención para el pentaclorofenol en función del pH.

Tabla 13. Influencia del pH en la retención del pentaclorofenol

Columna oxina-CPG 10 mm x 2.5 mm

Concentración = 10 mg/L; Caudal = 1.0 mL/min;

 $V_i = V_f = 10.0$ mL; Longitud de onda = 302 nm

PH	Retención, %
1.0	91.8
2.0	72.1
3.0	60.0

5.4.2. Influencia de la naturaleza de los fenoles en la retención

De acuerdo con el estudio realizado en el apartado 5.3. para los fenoles clorados, nitrados y metilados, el porcentaje más alto de retención fue el obtenido para el pentaclorofenol, 98.8%, y 2,4,6-triclorofenol, 73.2%. Como se puede observar para los clorofenoles en la tabla 1 a medida que disminuye el grado de cloración aumenta los valores de pKa y a medida que aumenta el grado de cloración, aumentan la retención como se muestra en la tabla 12.

Con relación a los nitrofenoles el mayor porcentaje de retención se observó para el 2-nitrofenol, 45.3%. La acidez aumenta cuando los sustituyentes se encuentran en la posición orto- o para- con respecto al grupo -OH, debido a la conjugación de estas posiciones con el grupo hidroxilo. Por otro lado la presencia de sustituyentes captadores de electrones (desactivantes) hacen aumentar la acidez del fenol.

Considerando los fenoles metilados el mayor porcentaje de retención fue para el 4-cloro-3-metilfenol, 46.0%, cuyo valor de pKa es elevado (9.72), esto significa que sustituyentes donadores de electrones (activantes), hacen disminuir la acidez del fenol al dificultar la deslocalización de la carga en el anillo aromático y consecuentemente disminuye la retención.

5.4.3. Influencia de la naturaleza de disolventes orgánicos en la retención del pentaclorofenol

De acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.4., este estudio se realizó para el pentaclorofenol con disolventes orgánicos puros y también saturados con HCl 0.1 M. Se registró la absorbancia máxima del pentaclorofenol en los distintos disolventes orgánicos, antes de pasar por la columna (A_m) y de la disolución de desecho (A_d). Los cálculos se realizaron de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{ Retención} = \frac{A_m - A_d}{A_m} \times 100$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la disolución de 10 mg/L a 302 nm

A_d = Absorbancia del desecho a 302 nm.

En la tabla 14 se presenta el porcentaje de retención obtenidos, con disolventes puros y en la tabla 15 con disolventes saturados con HCl 0.1 M.

Tabla 14. Estudio de la retención de pentaclorofenol en oxina – CPG con disolventes orgánicos.

Columna oxina-CPG 10 mm x 2.5 mm

Concentración = 10 mg/L; Caudal = 1.0 mL/min;

$V_i = V_f = 10.0$ mL; Longitud de onda = 302 nm

Disolventes Orgánicos	Retención, %
Diclorometano	–
n-Hexano	4.4
Cloroformo	20.9
Tetracloruro de carbono	2.6
Eter dietílico	–
1,2-Dicloroetano	18.9

Tabla 15. Estudio de la retención de pentaclorofenol en oxina – CPG con disolventes orgánicos saturados con HCl 0.1 M.

Columna oxina-CPG 10mm x 2.5 mm

Concentración = 10 mg/L; Caudal = 1.0 mL/min;

$V_i = V_f = 10.0$ mL; Longitud de onda = 302 nm

Disolventes Orgánicos, saturados con HCl 0.1M	Retención, %
Cloroformo	8.0
Tetracloruro de carbono	–
1,2-Dicloroetano	7.5

Se observan en las tablas 14 y 15 que la retención de pentaclorofenol en diferentes disolventes orgánicos es baja para los experimentos realizados con la columna oxina – CPG.

La elución de pentaclorofenol se realizó con acetonitrilo, pero no se observó banda máxima de absorción para hacer una evaluación de la recuperación probablemente por estar en el entorno de la banda de absorción del disolvente.

Dada la baja retención del pentaclorofenol en diclorometano, éste se podría usar como eluyente.

5.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PENTACLOROFENOL

5.5.1. Estabilidad del pentaclorofenol retenido en la columna oxina – CPG

Para el estudio de estabilidad del pentaclorofenol, se pasaron 10.0 mL de una disolución de 10 mg/L en medio acuoso a pH 1.0. Una vez retenido el pentaclorofenol se guardó la columna a 4°C, en una disolución de HCl 0.1M (pH 1.0), durante 4 días. Se realizó la elución con 10.0 mL de acetonitrilo y el espectro tenía la misma apariencia que el espectro hecho antes de la retención, pero como ya vimos en el apartado 5.3, el cálculo exacto de elución no fue posible pues el pentaclorofenol tiene el máximo de absorción en el entorno del disolvente. De acuerdo con este estudio la unión entre la oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (oxina – CPG) y el pentaclorofenol permanece a pH 1.0, durante por lo menos 4 días; la inmovilización también es una forma de aumentar la estabilidad del pentaclorofenol, pues él mismo no es estable a bajas concentraciones, siendo este procedimiento útil para almacenar muestras por un determinado período.

5.5.2. Estabilidad de la columna oxina – CPG con el paso de muestras

Para este estudio se pasaron 10.0 mL de una disolución de 10 mg/L de pentaclorofenol en medio acuoso a pH 1.0, y se hicieron los cálculos de la retención de acuerdo con los ya observados en la tabla 12. En días subsecuentes se realizaron experimentos con la misma columna y en las mismas condiciones para otros fenoles y fueron equivalentes a los que se presentan en la tabla 12.

De acuerdo con este estudio, si se hacen siempre los experimentos en medio acuoso a pH 1.0, la columna presenta estabilidad durante días, aunque se use para la retención y elución de otros fenoles.

5.6. ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD DE LA PRECONCENTRACIÓN DE PENTACLOROFENOL

5.6.1. Reproducibilidad de la retención del pentaclorofenol en una misma columna

Para este estudio se prepararon muestras de pentaclorofenol de 100 μg en 10.0 mL, en medio acuoso a pH 1.0. Inicialmente se pasaron por la columna oxina – CPG 10.0 mL de la muestra y se recogieron 10.0 mL de la disolución del desecho. Se midió la absorbancia máxima a 302 nm y se llevaron al calibrado del pentaclorofenol del apartado 5.2.1. La concentración obtenida en mg/L se transformó en μg considerando el volumen de 10.0 mL.

En la tabla 16 se presentan para la disolución del desecho la cantidad de pentaclorofenol no retenido y el porcentaje de retención.

De acuerdo con este estudio, se observa que la retención es muy alta y bastante reproducible.

Tabla 16. Estudio de reproducibilidad del porcentaje de retención del pentaclorofenol en una misma columna.

Cantidad de pentaclorofenol = 100 µg

Caudal = 1.0 mL/min

$V_i = V_f = 10.0$ mL

Longitud de onda = 302 nm

Muestra	Cantidad de PCF no Retenido, µg	Retención, %
1	8.1	92.0
2	7.5	92.5
3	14.9	87.1
Media	10.2	90.5
S_{n-1}	4.1	3.0

5.6.2. Reproducibilidad de la retención del pentaclorofenol en distintas columnas

Para el estudio de la reproducibilidad entre distintas columnas en oxina – CPG se prepararon muestras de pentaclorofenol de 100 µg en 10.0 mL, en medio acuoso a pH 1.0. Se pasaron por la columna 10.0 mL de la muestra y se recogieron 10.0 mL de la disolución del desecho. Se midió la absorbancia máxima a 302 nm y se llevaron al calibrado del apartado 5.2.1. La concentración obtenida en mg/L se transformó en µg considerando el volumen de 10.0 mL.

En la tabla 17 se presenta para la disolución de desecho la cantidad de pentaclorofenol no retenido y el porcentaje de retención. Como muestran los resultados de la tabla 17 la reproducibilidad de la retención sigue estando en el entorno del 90.0%, como en el caso de utilizar una misma columna y con una reproducibilidad semejante.

Tabla 17. Estudio de reproducibilidad del porcentaje de retención del pentaclorofenol en distintas columnas.

Cantidad de pentaclorofenol = 100 μg

Caudal = 1.0 mL/min

$V_i = V_f = 10.0$ mL

Longitud de Onda = 302 nm

Muestra	Cantidad de PCF no Retenido, μg	Retención, %
1	8.1	92.0
2	16.1	84.0
3	11.6	88.4
Media	12.0	88.1
S_{n-1}	3.6	4.0

Comparando el porcentaje de retención del pentaclorofenol en la misma columna y en distintas columnas, no se observan diferencias significativas.

5.7. ESTUDIO CONJUNTO DE CLOROFENOLES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Dado que en muestras medioambientales la cantidad de fenoles contaminantes prioritarios esperada está al nivel de mg/L y $\mu\text{g/L}$, como ya se ha visto en la revisión bibliográfica, es necesaria su preconcentración antes de la determinación cromatográfica con detección espectrofotométrica. Para esto se hizo un estudio conjunto de los clorofenoles que más se retenían, de acuerdo con el estudio espectrofotométrico.

5.7.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

5.7.1.1. Elección de la longitud de onda

Como cada clorofenol absorbe a una longitud de onda máxima distinta y dado que se dispone de un detector monocanal, se procedió a la elección de la longitud de onda de trabajo, buscando una sensibilidad de compromiso para los tres clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol.

Se utilizó para la separación la fase móvil MeOH: CH_3CN : 30 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5.0 (10:34:56) que ya había sido descrita en la bibliografía (66) para la separación de estos fenoles.

Registramos los cromatogramas de cada clorofenol en concentraciones de 15.0 mg/L en metanol a un caudal de 1.0 mL/min con la siguiente fase móvil MeOH: CH_3CN : 30 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5.0 (10:34:56), a dos longitudes de onda 240 nm y 254 nm. Se observó en los cromatogramas que la mayor sensibilidad fue para 240 nm, la cual se consideró como longitud de onda óptima para el estudio conjunto de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol.

5.7.1.2. Optimización del pH

Para este estudio se procedió a revisar la influencia del pH de la fase móvil. Se prepararon mezclas de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol con concentraciones de 4.5 mg/L, 2.0 mg/L y 4.0 mg/L en metanol, respectivamente. Se registraron los cromatogramas a la longitud de onda óptima 240 nm, a un caudal de 1.0 mL/min y fase móvil MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄ (35:25:40). Los pH estudiados fueron 5.1, 5.2 y 5.3.

Los resultados se presentan en la tabla 18, donde puede observarse la variación de los tiempos de retención con el pH. De estos datos y de la figura 13 se deduce que el pH óptimo es de 5.1, ya que es el pH al cual, se separan mejor los clorofenoles en el menor tiempo de retención.

Tabla 18. Optimización del pH.

Fase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄ (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min; Longitud de onda = 240 nm

pH	Tiempo de retención, minutos		
	Pentaclorofenol	2,4,6-Triclorofenol	2,4-Diclorofenol
5.1	4.76	8.08	5.73
5.2	8.53	13.62	9.33
5.3	19.43	17.90	10.06

De acuerdo con este estudio, el pH influye tanto en la posición relativa de los clorofenoles, como también en el tiempo total del análisis. Mientras que a pH 5.1 el primero en eluirse es el pentaclorofenol, a pH 5.3 el primero en eluirse es el 2,4-diclorofenol, y el tiempo total del cromatograma es más de el doble a pH 5.3 que a pH 5.1.

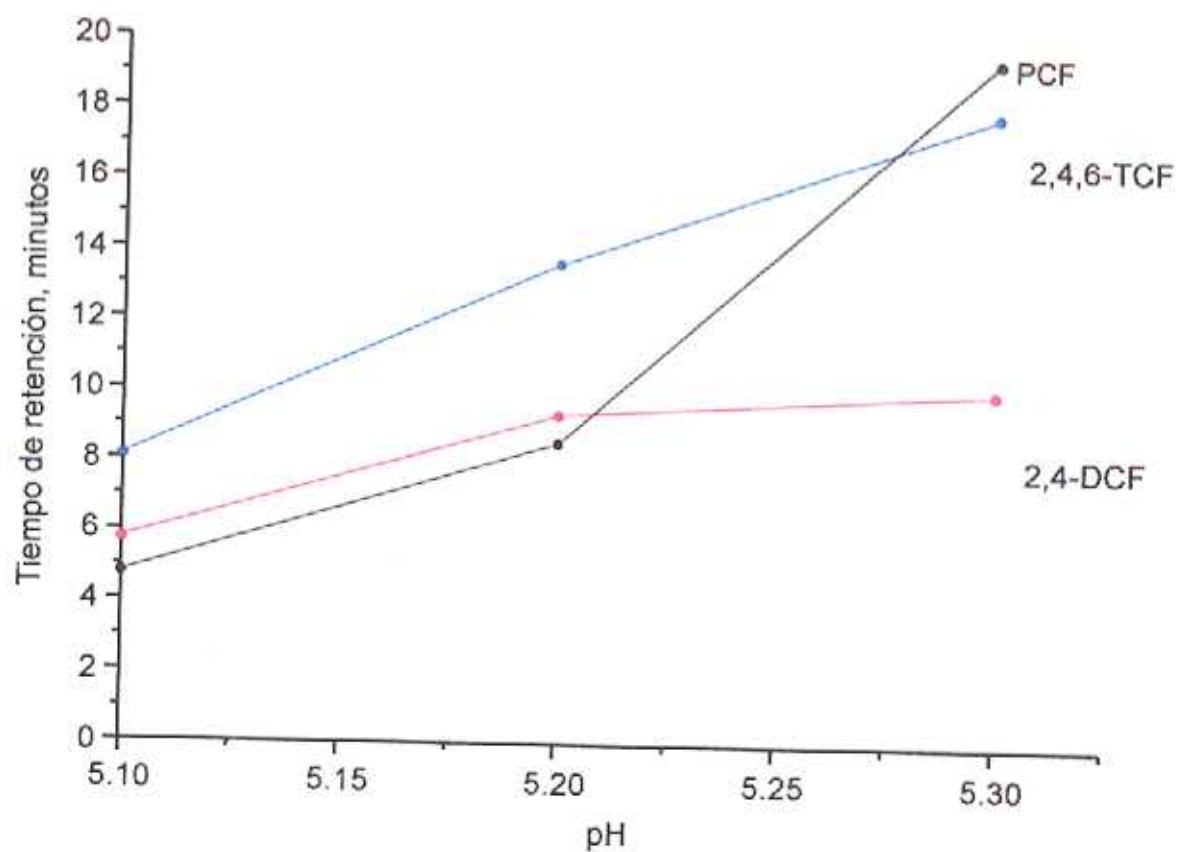


Figura 13. Variación del tiempo de retención con el pH

Fase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄ (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

5.7.1.3. Elección de la fase móvil

Tomando como referencia los estudios realizados con anterioridad por otros autores (66), para este estudio se prepararon diferentes fases móviles ternarias para saber cuál es la que mejor separaría la mezcla de clorofenoles. Se prepararon fases móviles ternarias de MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1, comprendidas entre 35:25:40 y 25:25:50. En la tabla 19 se presentan las fases móviles, los tiempos de retención y factores de capacidad (k) obtenidos para los clorofenoles estudiados.

Tabla 19. Influencia de la fase móvil en la separación cromatográfica de clorofenoles

Fase Móvil	PCF		2,4,6-TCF		2,4-DCF	
	tr, min	k	tr, min	k	tr, min	k
MeOH : CH ₃ CN : 30 mM CH ₃ COONH ₄ pH 5.1 (30:25:45)	11.30	0.5	13.38	0.78	8.00	0.06
MeOH : CH ₃ CN : 30 mM CH ₃ COONH ₄ pH 5.1 (25:25:50)	16.99	0.78	16.99	0.78	10.20	0.07
MeOH : CH ₃ CN : 30 mM CH ₃ COONH ₄ pH 5.1 (35:25:40)	4.76	0.20	8.08	1.02	5.73	0.43

tr, min = tiempo de retención, minutos

k = factor de capacidad

La separación cromatográfica óptima fue para la fase móvil MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40), pues es en la que los clorofenoles quedan mejor resueltos y con un tiempo de retención inferior a 8.0 minutos. En la figura 14 se presenta el cromatograma para una mezcla de clorofenoles.

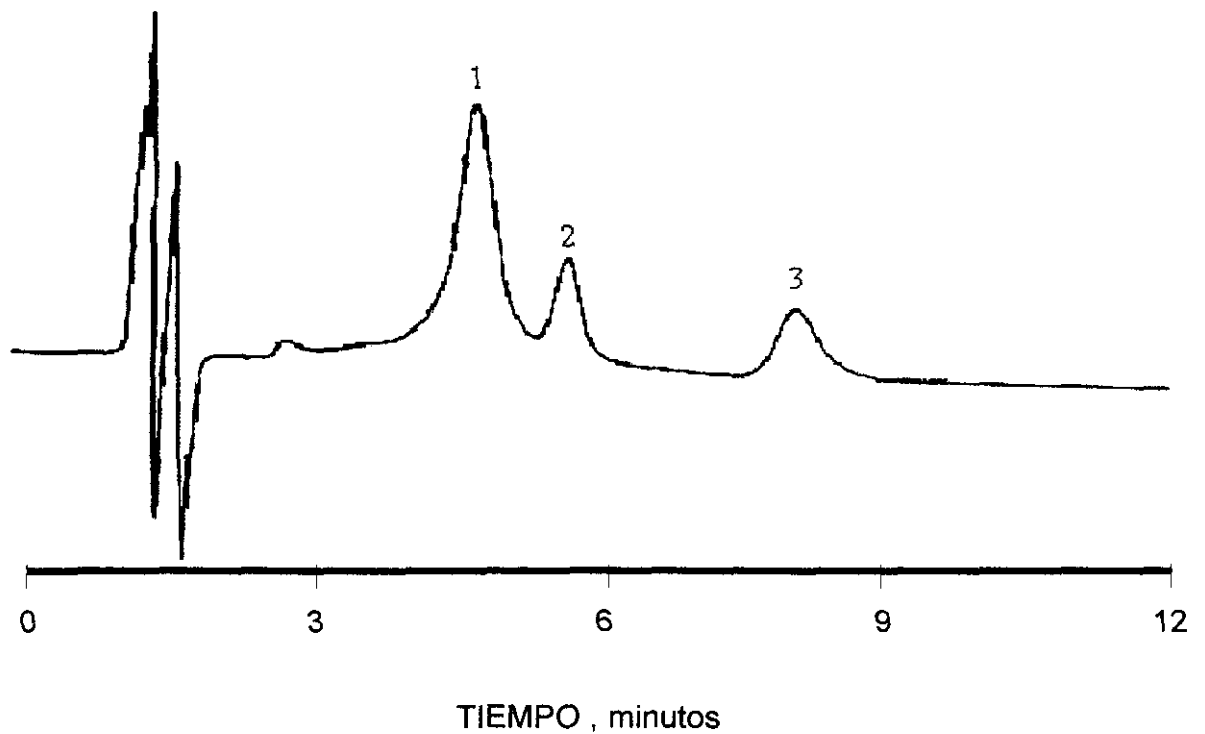


Figura 14. Cromatograma de una mezcla de clorofenoles

Columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm

Fase móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

1: PCF = 4.5 mg/L, 2: 2,4-DCF = 4.0 mg/L, 3: 2,4,6-TCF= 2.0 mg/L

5.7.2. Características analíticas de la determinación de clorofenoles por HPLC

5.7.2.1. Calibrado de los clorofenoles

De acuerdo con el procedimiento expuesto en el apartado 4.3.5., se realizaron los calibrados del área frente a la concentración de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección espectrofotométrica UV, utilizando la columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm.

El intervalo de concentración para el calibrado de cada clorofenol fue pentaclorofenol de 1.5 a 4.5 mg/L, 2,4,6-triclorofenol de 0.5 a 3.5 mg/L y 2,4-diclorofenol de 1.0 a 5.0 mg/L. En la tabla 20 se presentan las rectas de regresión y el coeficiente de correlación (r) para cada clorofenol. En todos los casos las respuestas lineales en los intervalos de concentración estudiados también se pueden apreciar coeficientes de correlación iguales o superiores a 0.9946.

Tabla 20. Rectas de regresión y coeficientes de correlación (r) para los clorofenoles estudiados.

Columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm

Fase móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

Clorofenoles	Recta de regresión, Área = B C + D	Coefficiente de correlación, r
Pentaclorofenol	Área = 40952.1 C - 14271.6	0.9958
2,4,6-Triclorofenol	Área = 18857.3 C + 1430.3	0.9949
2,4-Diclorofenol	Área = 8739.3 C + 2643.1	0.9946

B = pendiente

C = concentración, mg/L

D = ordenada en el origen

De acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 4.3.5., también se obtuvo el calibrado del área frente a la concentración del pentaclorofenol, con las mismas condiciones citadas en la tabla 20, pero usando la columna Supercosil LC - 18 150 x 3.0 mm.

El margen de concentración para hacer el calibrado del pentaclorofenol fue de 0.07 a 8.0 mg/L, obteniéndose la recta de regresión; Área = 55579.5 C – 8538.3 y coeficiente de correlación 0.9949.

5.7.2.2. Límite de detección y cuantificación

La determinación del límite de detección (L.D.) se realizó según el criterio de la relación señal/ruido (S/N = 3). Para eso, se preparan e inyectan disoluciones sucesivamente más diluidas de los clorofenoles de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 4.3.5. Se registran los correspondientes cromatogramas hasta que la señal de los analitos se confunde con el ruido del cromatograma, considerándose el triple de esta mínima concentración detectada como el límite de detección.

El límite de cuantificación (L.C.) es definido como 10 veces la relación señal/ruido.

En la tabla 21 se presentan los valores del límite de detección y cuantificación para los clorofenoles estudiados.

Tabla 21. Límite de detección y cuantificación para los clorofenoles estudiados

Columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm

Fase móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

Clorofenoles	L.D., mg/L	L.C., mg/L
Pentaclorofenol	0.10	0.33
2,4,6-Triclorofenol	0.10	0.33
2,4-Diclorofenol	0.20	0.67

5.7.2.3. Reproducibilidad

Para el estudio de la reproducibilidad se utilizaron cinco determinaciones para un valor representativo en la zona intermedia del calibrado de clorofenoles, según el procedimiento del apartado 4.3.5. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 22, para la mezcla de clorofenoles.

Tabla 22. Estudio de la reproducibilidadFase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

Clorofenoles	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	Media	S _{n-1}	S _r , %
Pentaclorofenol, mg/L	2.56	2.38	2.53	2.22	2.40	2.42	0.12	5.0
2,4,6-Triclorofenol, mg/L	2.79	2.71	2.92	2.68	2.71	2.76	0.10	3.5
2,4-Diclorofenol, mg/L	2.76	2.41	2.68	2.51	2.60	2.60	0.14	5.3

M = muestra



5.8 PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE CLOROFENOLES Y DETERMINACIÓN POR HPLC

Para la preconcentración selectiva de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, se utiliza el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.3.4. para la retención y elución de los fenoles. Con relación a la determinación de clorofenoles por HPLC, se usan las condiciones optimizadas en el estudio conjunto de clorofenoles descrito en el apartado 5.7.

5.8.1. Estudio de la preconcentración selectica de clorofenoles en columna oxina – CPG y análisis por HPLC

Para la preconcentración selectiva de clorofenoles se pasa a través de la columna oxina – CPG 10.0 mL de una mezcla de clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, en concentración de 3.0 mg/L, cada uno, a pH 1.0 y a un caudal de 0.6 mL/min. Una vez retenida la mezcla de clorofenoles, se eluye con acetonitrilo a un caudal de 0.6 mL/min, recogiendo 10.0 mL. A continuación se analiza por HPLC de acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.5.

Aplicando en calibrados descritos en el apartado 5.7.2.1., los porcentajes de retención y elución obtenidos se presentan en la tabla 23. Los porcentajes de retención son concordantes con los obtenidos por espectrofotometría UV-VIS.

Tabla 23. Estudio de la preconcentración de clorofenoles y análisis por HPLC.

PCF, 2,4,6-TCF, 2,4-DCF = 3.0 mg/L

pH = 1.0; Eluyente = acetonitrilo; $V_i = V_f = 10.0$ mLFase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

Clorofenoles	Retención*, %	S_{n-1}	Elución*, %	S_{n-1}
Pentaclorofenol	100	–	95.4	1.2
2,4,6-Triclorofenol	75.1	2.5	66.0	2.1
2,4-Diclorofenol	45.1	4.0	40.6	0.8

* media de 3 experimentos

5.8.2. Evaluación del volumen de ruptura

El volumen de ruptura hace referencia a la cantidad de clorofenol que se puede preconcentrar y recuperar en volúmenes crecientes de disolución hasta llegar a un volumen donde dejan de ser constantes los datos de recuperación.

Para el estudio del volumen de ruptura se pasan sucesivamente disoluciones acuosas a pH 1.0 conteniendo 30 µg de clorofenol en 10.0, 25.0 y 50.0 mL a través de la columna oxina – CPG a un caudal de 0.6 mL/min. Una vez retenido el clorofenol, se eluye con 10.0 mL de acetonitrilo a un caudal de 0.6 mL/min. A continuación se analiza por HPLC de acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.5. y se calcula la cantidad recuperada de cada clorofenol.

En la tabla 24 y en la figura 15 se presentan los resultados obtenidos y se puede observar que el volumen de ruptura para el pentaclorofenol y 2,4,6-triclorofenol es 50.0 mL y para el 2,4-diclorofenol 25.0 mL, cuando se preconcentran conjuntamente.

Tabla 24. Determinación del volumen de ruptura de clorofenoles

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal = 0.6 mL/min

Vo, mL	10.0		25.0		50.0	
Clorofenoles	C, μg	C/Co	C, μg	C/Co	C, μg	C/Co
Pentaclorofenol	29.0	0.96	27.2	0.91	20.3	0.67
2,4,6-Triclorofenol	15.5	0.52	10.7	0.36	9.2	0.30
2,4-Diclorofenol	14.2	0.47	2.3	0.28	–	–

Co = 30 μg : pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol

C = μg (Recuperado)

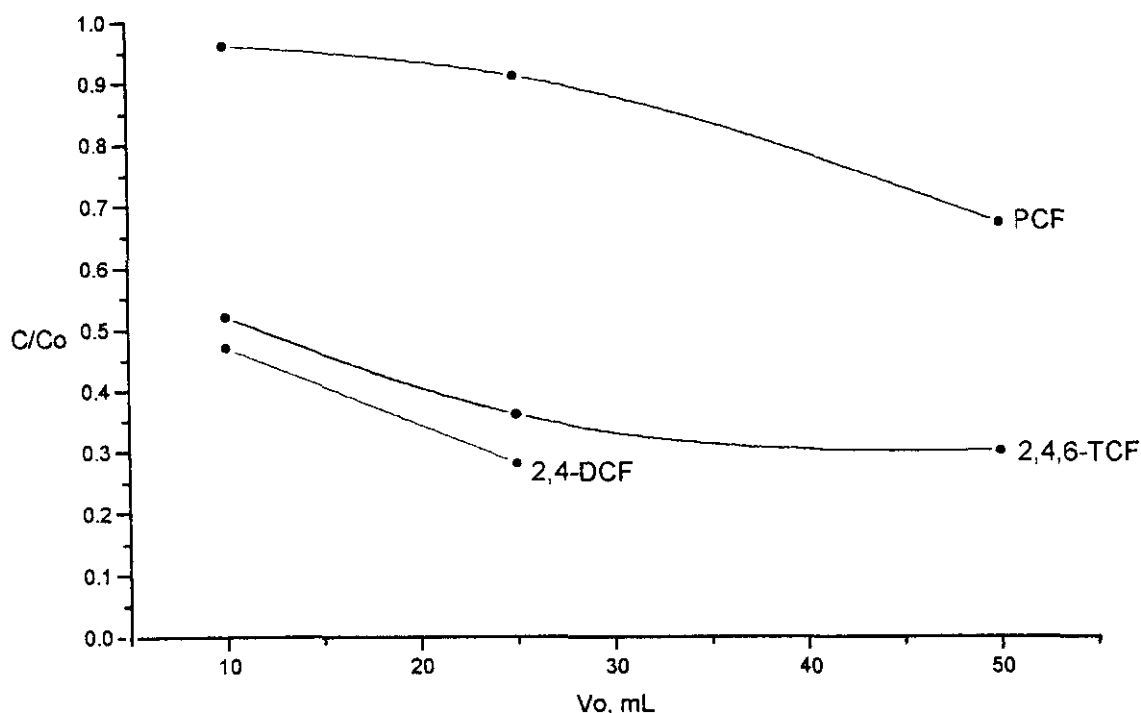


Figura 15. Determinación del volumen de ruptura de clorofenoles

PCF = pentaclorofenol, 2,4,6-TCF = 2,4,6-triclorofenol, 2,4-DCF = 2,4-diclorofenol

5.8.3. Estudio de la influencia de la concentración

Para estudiar la influencia de la concentración se pasan por la columna oxina-CPG disoluciones acuosas de clorofenoles a pH 1.0, usando el procedimiento del apartado 4.3.5., manteniendo el volumen de la muestra en 10.0 mL y aumentando la concentración de los clorofenoles. En la tabla 25 y en la figura 16 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que para el pentaclorofenol en las concentraciones 2.0, 3.0 y 4.0 mg/L, el porcentaje de retención es 100 %, para el 2,4,6-triclorofenol en la concentración de 4.0 mg/L el

porcentaje de retención es 77.3 % y para el 2,4-diclorofenol para la concentración de 8.0 mg/L el porcentaje de retención es 38.2 %.

Los porcentajes de retención obtenidos para los clorofenoles por HPLC son concordantes con los obtenidos por espectrofotometría ultravioleta – visible. Se observa también que los porcentajes de elución son muy próximos a los de retención.

Tabla 25. Estudio de la influencia de la concentración

Fase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

V_i = V_f = 10.0 mL

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

C, mg/L	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	10.0
CF	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %	R, % E, %
PCF	85.9 77.0	100 88.0	100 78.9	100 98.4	- -	79.4 74.5	- -	- -	- -
2,4,6-TCF	- -	51.8 39.4	73.4 68.2	77.3 59.9	62.9 70.2	- -	59.8 32.2	- -	- -
2,4-DCF	24.5 59.8	- -	35 41.5	32.4 44.2	- -	28.8 30.4	- -	38.2 -	30.4 -

C = concentración, mg/L, CF = clorofenoles, PCF = pentaclorofenol

2,4,6-TCF = 2,4,6-triclorofenol, 2,4-DCF = 2,4-diclorofenol

R, % = % de retención; E, % = % de elución

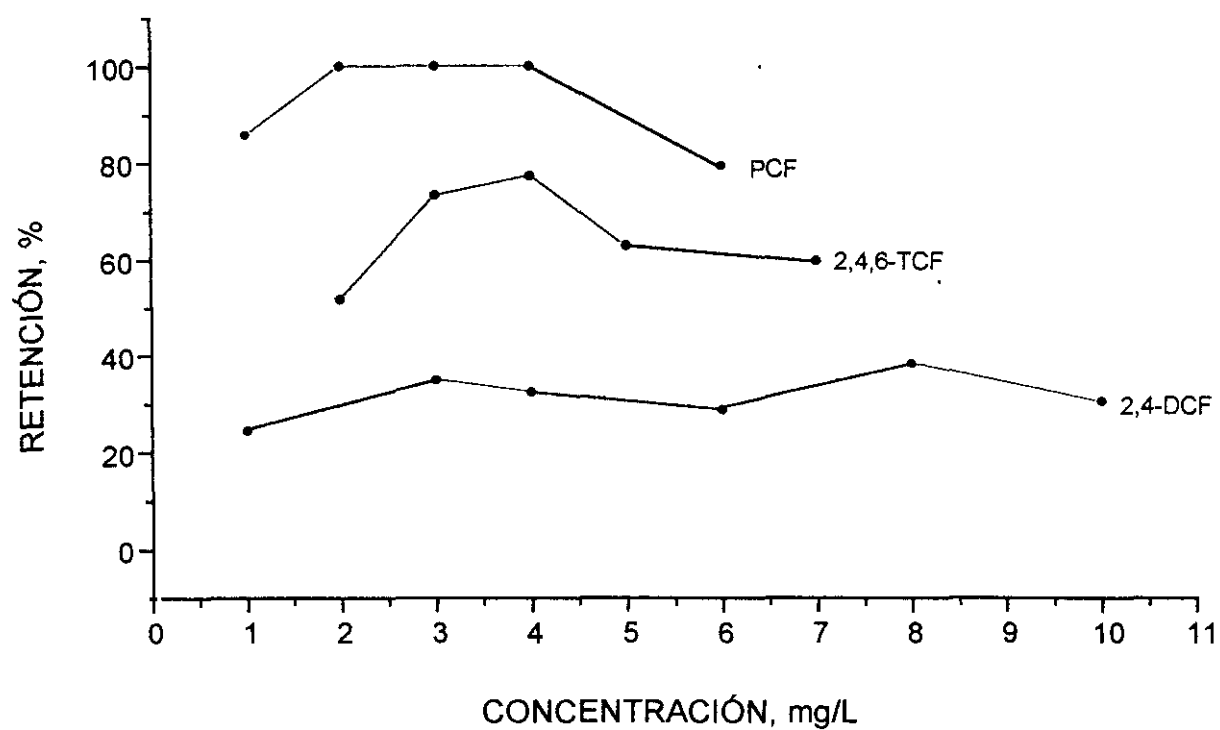


Figura 16. Estudio de la influencia de la concentración

PCF = pentaclorofenol, 2,4,6-TCF = 2,4,6-triclorofenol, 2,4-DCF = 2,4-diclorofenol

5.8.4. Estudio de la elución del pentaclorofenol en acetonitrilo

De acuerdo con el calibrado del pentaclorofenol obtenido en el apartado 5.7.2.1 usando la columna Supercosil LC – 18, se estudió la posibilidad de eluir el pentaclorofenol en el menor volumen posible de acetonitrilo.

Se preparó una disolución de 10.0 mL a pH ácido de pentaclorofenol de 1.088 mg/L. Primero se acondiciona la columna oxina – CPG pasando 10.0 mL de acetonitrilo y luego 10.0 mL de HCl 0.1 M. A continuación se pasa la disolución de pentaclorofenol y después se eluye con acetonitrilo de la siguiente manera: se recoge primero 1.0 mL y a continuación fracciones sucesivas de 1.0 mL, 2.0 mL, 2.0 mL y finalmente 5.0 mL. Seguidamente se mide la cantidad obtenida en el calibrado del apartado 5.7.2.1 con la columna Supercosil LC – 18 y se calcula la recuperación. En la tabla 26 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 26. Estudio de la elución del pentaclorofenol en acetonitrilo

Cantidad de pentaclorofenol = 10.88 μg

V_{ACN} (fracciones), mL	V_{ACN} (total), mL	μg Recuperados	Recuperación, %
1.0	1.0	9.46	87.0
1.0	2.0	1.54	14.0
2.0	4.0	1.66	15.0
2.0	6.0	1.55	14.0
5.0	11.0	0.35	3.0

V_{ACN} = Volumen de acetonitrilo

A la vista de estos resultados se decidió que 1.0 mL de acetonitrilo era suficiente para recuperar la mayor parte del pentaclorofenol. También se determinó la cantidad no retenida y se obtuvieron 0.74 μg , lo que supone 6.8%.

En la figura 17 se presentan los cromatogramas de las fracciones de elución de pentaclorofenol en acetonitrilo. En esta figura, PCP 1 en rojo corresponde al primer mililitro, PCP 2 en verde al segundo mililitro, la PCP 3 en azul a los 2.0 mL siguientes, la PCP 4 en negro a los otros dos mililitros y finalmente la PCP 5 en violeta a lo recogido en los últimos 5.0 mL.

Se observa que el pentaclorofenol con la columna Supercosil LC – 18 se eluye entre 5.22 y 5.45 minutos, o sea un poco más tarde que en la columna Spherisorb 5 ODS, en la que salió a 4.76 minutos.

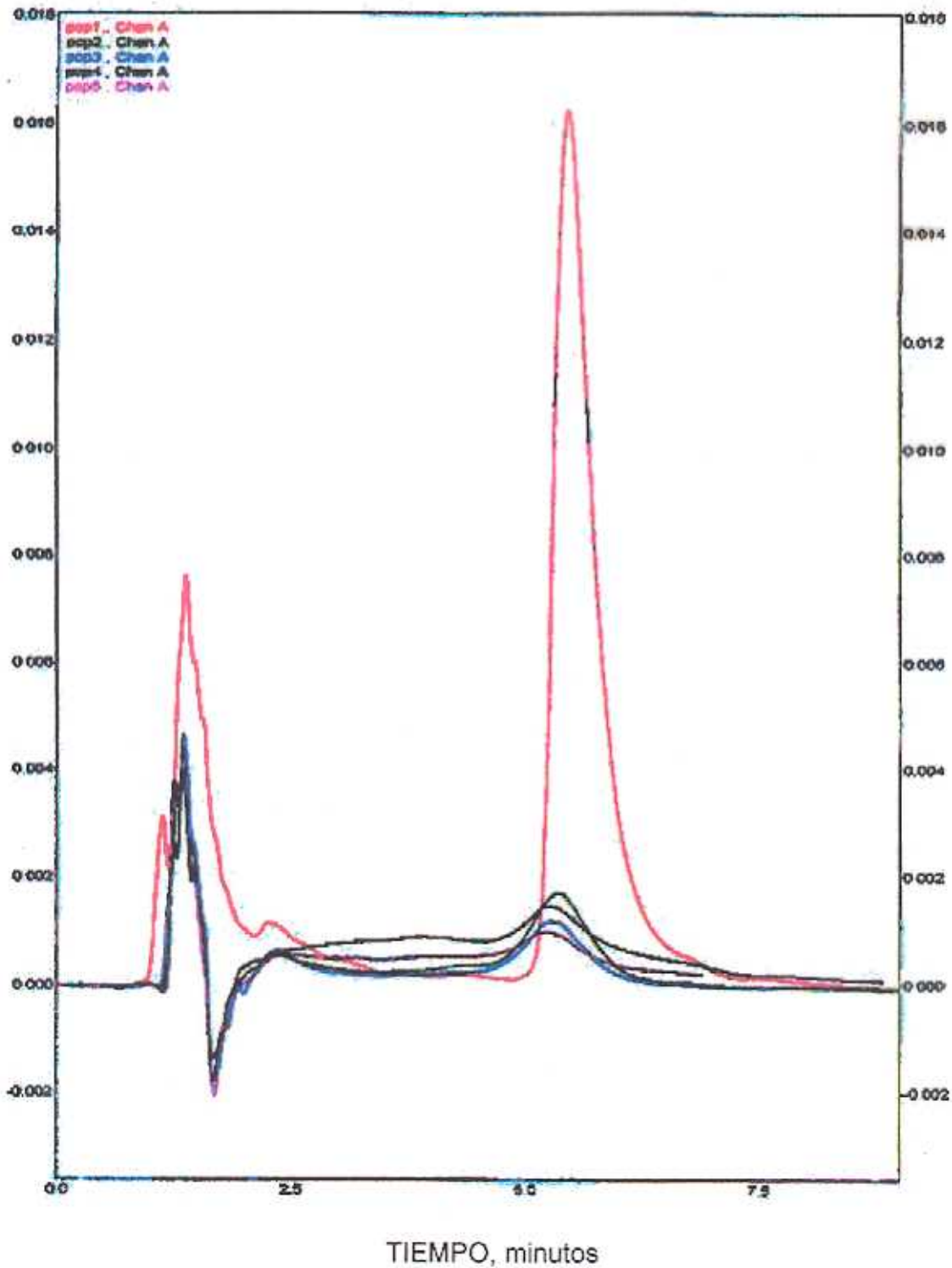


Figura 17. Cromatogramas de la elución del pentaclorofenol en acetonitrilo

Columna Supercosil LC-18 150 x 3.0 mm

Fase móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min ; Longitud de onda = 240 nm

5.9. ESTUDIO CONJUNTO DE NITROFENOLES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

5.9.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

5.9.1.1. Elección de la longitud de onda

Se realizó un estudio por espectrofotometría ultravioleta – visible con la finalidad de seleccionar una longitud de onda de compromiso que permitiera la detección simultánea de los nitrofenoles 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. Para ello se prepararon disoluciones de los nitrofenoles en concentración de 5.0 mg/L en la fase MeOH : H₂O, pH 5.1 (60:40). A continuación se registraron los espectros entre 190 y 500 nm, los cuales se presentan en la figura 18. Observándose que los espectros del 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol son muy similares y con la longitud de onda del máximo de absorción a 376 nm. Por lo que respecta al 2-nitrofenol presenta un máximo de absorción relativa a 346 nm.

En función de los espectros, se eligió 350 nm como longitud de onda de detección para la determinación de los nitrofenoles mediante cromatografía líquida.

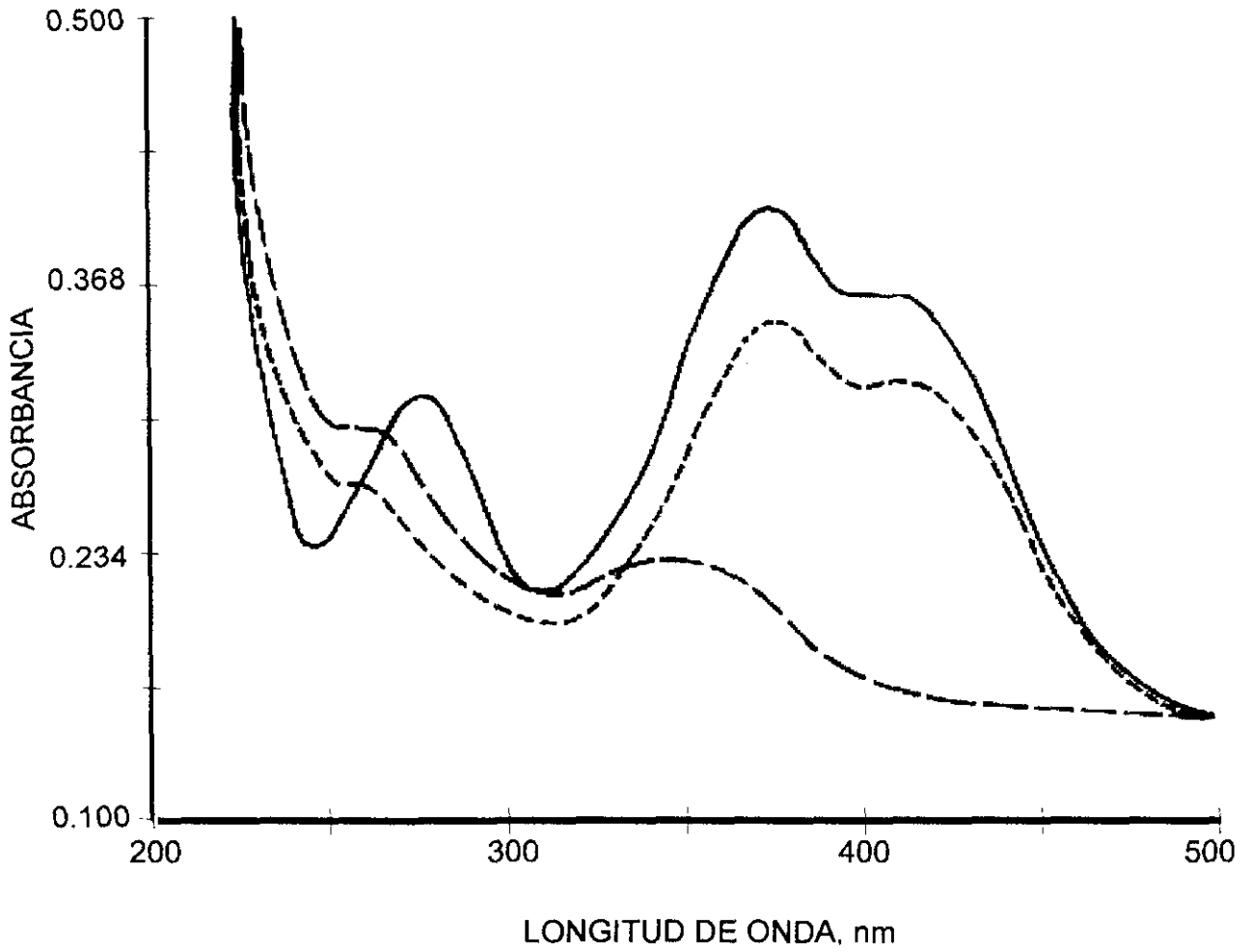


Figura 18. Espectros de absorción de los nitrofenoles

- 2,4-Dinitro-6-secbutilfenol
- - - - 4,6-Dinitro-2-metilfenol
- · - · 2-Nitrofenol

5.9.1.2. Optimización del pH

Para estudiar la influencia del pH de la fase móvil en el comportamiento cromatográfico, se prepararon disoluciones de 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol y se registraron los cromatogramas de cada compuesto a 350 nm, con la fase móvil MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH (60:40) en los pH 3.5, 4.0, 4.2 y 4.4, a un caudal de 1.0 mL/min.

Los resultados se presentan en la tabla 27, donde se observa la variación de los tiempos de retención con el pH. De estos datos y observando la figura 19 se deduce que el pH de compromiso es de 4.2 pues a este pH, el 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol se separan mejor y además el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, queda más próximo a los otros nitrofenoles.

Tabla 27. Optimización del pH.

Fase Móvil = MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH (60:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 350 nm

pH	Tiempo de retención, minutos		
	2-Nitrofenol	4,6-Dinitro-2-metilfenol	2,4-Dinitro-6-secbutilfenol
3.5	5.30	7.00	17.50
4.0	5.10	4.50	18.20
4.2	5.50	4.40	16.00
4.4	5.50	3.60	13.50

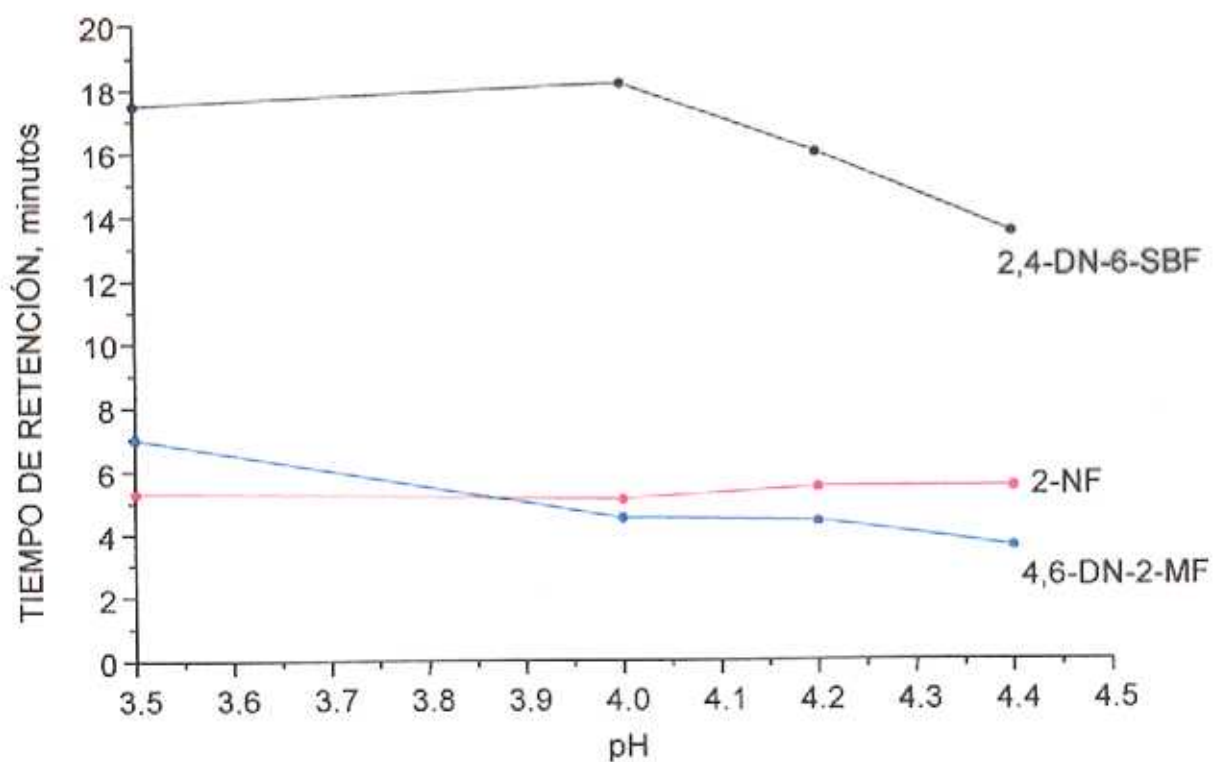


Figura 19. Optimización del pH

Fase Móvil = MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH (60:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 350 nm

5.9.1.3. Elección de la fase móvil

Siendo los nitrofenoles compuestos bastante polares, es de esperar que su separación cromatográfica en columna C-18 requiera fases móviles de polaridad relativamente alta.

Para la elección de la fase móvil se prepararon una serie de mezclas binarias de MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH (pH 4.2) comprendidas entre 60:40 y 70:30.

En la tabla 28 se presentan las fases móviles y los tiempos de retención obtenidos para los nitrofenoles estudiados.

Tabla 28. Influencia de la fase móvil en la separación cromatográfica de nitrofenoles.

Fase Móvil	Tiempo de retención, minutos		
	2-NF	4,6-DN-2-MF	2,4-DN-6-SBF
MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (60:40)	5.30	7.00	15.70
MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35)	3.60	2.60	6.60
MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (70:30)	3.10	3.50	8.20

De los resultados obtenidos se observan que la mejor separación cromatográfica es para la fase móvil MeOH: 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35), pues con ella los tiempos de retención son inferiores a 7.00 minutos. En la figura 20 se presenta el cromatograma para una mezcla de nitrofenoles.

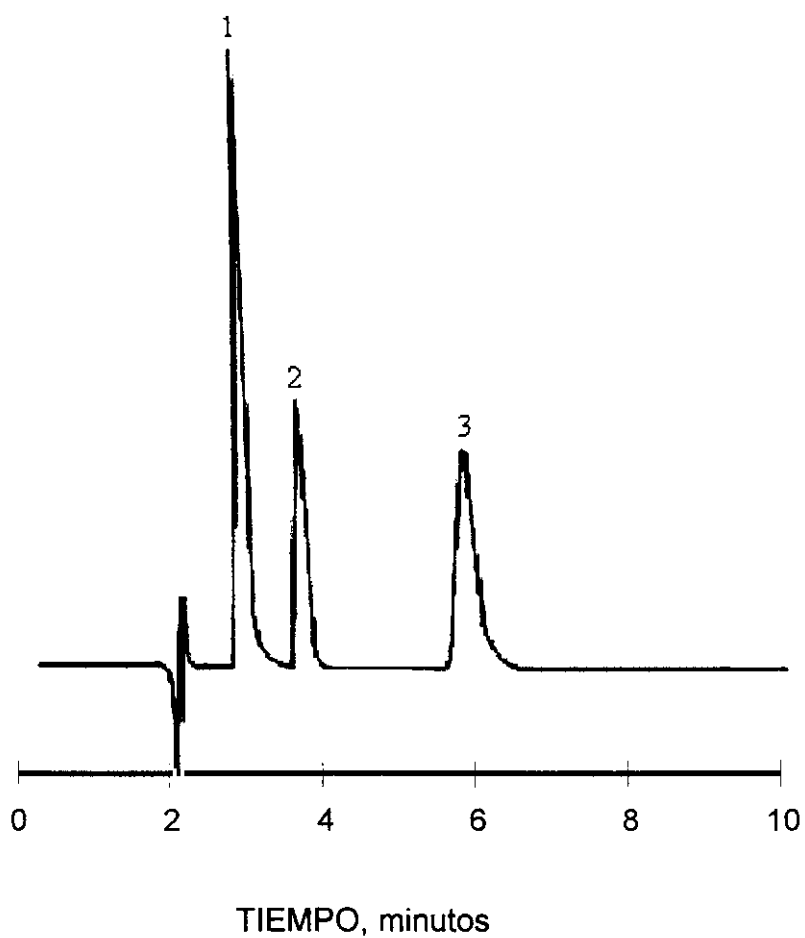


Figura 20. Cromatograma de una mezcla de nitrofenoles

Columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm

Fase móvil = MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 350 nm

1: 4,6-DN-2-MF, 2: 2-NF, 3: 2,4-DN-6-SBF

5.9.2. Características analíticas de la determinación de los nitrofenoles por HPLC

5.9.2.1. Calibrados de los nitrofenoles

Siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 4.3.7., se han realizado calibrados de la respuesta cromatográfica expresada en áreas frente a la concentración de los nitrofenoles 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, a través de cromatografía líquida de alta eficacia con detección espectrofotométrica UV-VIS.

El intervalo de concentración para el calibrado de los nitrofenoles fue para el 2-nitrofenol de 0.1 a 1.5 mg/L, para el 4,6-dinitro-2-metilfenol de 0.05 a 1.0 mg/L y para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol de 0.3 a 1.0 mg/L.

En la tabla 29 se presentan las rectas de regresión y el coeficiente de correlación (r) para cada nitrofenol. Se observan coeficientes de correlación iguales o superiores a 0.9980.

Tabla 29. Recta de regresión y coeficiente de correlación (r) de los nitrofenoles.

Columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm

Fase móvil = MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 350 nm

Nitrofenoles	Recta de regresión, Área = B C + D	Coefficiente de correlación, r
2-Nitrofenol	Área = 28710.6 C – 1552.1	0.9986
4,6-Dinitro-2-metilfenol	Área = 50360.4 C + 1069.6	0.9980
2,4-Dinitro-6-secbutilfenol	Área = 44297.1 C – 3395.4	0.9993

B = pendiente

C = concentración, mg/L

D = ordenada en el origen

5.9.2.2. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (L.D.) se realiza siguiendo el criterio de 3 veces la relación señal/ruido ($S/N = 3$). Para determinarlo, se preparan e inyectan disoluciones sucesivamente más diluidas de los nitrofenoles, de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 4.3.7. A continuación se registran los correspondientes cromatogramas hasta que la señal del analito se confunde con el ruido, se considera que el triple de esta mínima concentración como el límite de detección. Se considera el límite de cuantificación (L.C.) como 10 veces la relación señal/ruido.

En la tabla 30 se presentan los valores del límite de detección y cuantificación para los nitrofenoles estudiados.

Tabla 30. Límite de detección y cuantificación de los nitrofenoles

Columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm

Fase móvil = MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 350 nm

Nitrofenoles	L.D., µg/L	L.C., µg/L
2-Nitrofenol	20	67
4,6-Dinitro-2-metilfenol	10	33
2,4-Dinitro-6-secbutilfenol	60	200

5.9.2.3. Reproducibilidad

Para el estudio de la reproducibilidad se utilizaron cinco determinaciones para una mezcla de nitrofenoles según el procedimiento descrito en el apartado 4.3.7.

En tabla 31 se presentan los valores obtenidos para la mezcla de nitrofenoles.

Tabla 31. Reproducibilidad de una mezcla de nitrofenoles

Fase Móvil = MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 350 nm

Nitrofenoles	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	Media	S _{n-1}	S _r , %
2-Nitrofenol, mg/L	1.59	1.58	1.56	1.53	1.55	1.56	0.02	1.5
4,6-Dinitro-2-metilfenol, mg/L	1.64	1.64	1.62	1.65	1.60	1.63	0.02	1.2
2,4-Dinitro-6-secbutilfenol, mg/L	1.65	1.63	1.64	1.62	1.66	1.64	0.02	1.0

M = muestra

5.10. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE NITROFENOLES Y DETERMINACIÓN POR HPLC

5.10.1. Estudio previo de preconcentración selectiva de nitrofenoles en columna oxina – CPG

Para la preconcentración selectiva de los nitrofenoles 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, inicialmente se utiliza el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.3.4. para la retención y elución de los fenoles. Se pasaron a través de la columna oxina – CPG 10.0 mL de una mezcla de los nitrofenoles en concentración de 1.6 mg/L cada uno a un caudal de 0.6 mL/min. Se acondiciona la columna oxina-CPG previamente con 10.0 mL de acetonitrilo seguido de 10.0 mL de ácido clorhídrico 0.1 M. Una vez retenido la mezcla de nitrofenoles, se eluye con acetonitrilo, y se recogen 10.0 mL.

Los porcentajes de recuperación para el 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol obtenidos fueron, 9.0 %, 1.0 % y 3.0 % respectivamente, los cuales son mucho más bajos que los obtenidos en el estudio espectrofotométrico. En consecuencia, se decidió estudiar el acondicionamiento de la columna con disoluciones de nitrato de hierro(III). De acuerdo con la bibliografía (213), el hierro(III) se une a la 8-hidroxiquinolina formándose una fase estacionaria que es adsorbente y selectiva para los grupos hidroxilo de los componentes fenólicos. La adsorción de los analitos a los iones hierro (III) inmovilizados está basada en la formación de complejos los cuales son dependientes del pH. Con oxina-CPG el hierro (III) está unido covalentemente a la 8-hidroxiquinoleína y la formación de complejos depende del pH.

Tras pasar 10.0 mL de una disolución 10 mM de nitrato de hierro (III) antes de la preconcentración de la mezcla de nitrofenoles de 1.6 mg/L de concentración cada uno, se observó un aumento considerable en la retención del 2-nitrofenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. Sin embargo, para el 4,6-dinitro-2-metilfenol fue todavía baja, aunque mayor que en las condiciones anteriores.

En la tabla 32 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos.

Tabla 32. Estudio de la recuperación de nitrofenoles previo acondicionamiento con una disolución 10 mM de nitrato de hierro (III).

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal (elución) = 0.6 mL/min

V_i = 10.0 mL

V_f = 2.0 mL

Nitrofenoles	Recuperación, %
2-Nitrofenol	63
4,6-Dinitro-2-metilfenol	18
2,4-Dinitro-6-secbutilfenol	86

A partir de estos datos se incluyó la disolución de nitrato de hierro (III) como acondicionamiento previo para la preconcentración de nitrofenoles.

Debido a la fuerte adsorción de los nitrofenoles, especialmente el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, la desorción con acetonitrilo fue escasa o nula, siendo necesario hacer un estudio para la optimización de la elución. Se prepararon disoluciones de ácido clorhídrico de diferentes concentraciones y tampones de diferentes pH. Se pasaron disoluciones de los nitrofenoles de 1.6 mg/L cada una, contenidos en 10.0 mL de disolución y recogiendo 2.0 mL, para la optimización de la elución.

En la tabla 33 se presentan los resultados obtenidos para la optimización de la elución de los nitrofenoles, observándose que el mejor eluyente es la fase móvil MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35).

Tabla 33. Optimización de la elución de los nitrofenoles.

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal (retención) = 1.0 mL/min

Caudal (elución) = 0.6 mL/min

Vi = 10.0 mL

Vf = 10.0 mL

Nitrofenoles	Eluyente									
	HCl 0.1 M		HCl 0.2 M		HCl 0.4 M		Tampón acetato sódico pH 4.0		Fase móvil MeOH : 30 mM HCOOH/NaCOOH pH 4.2 (65:35)	
	R, %	E, %	R, %	E, %	R, %	E, %	R, %	E, %	R, %	E, %
2-NF	52.0	11.0	46.0	10.0	52.0	11.0	48.0	11.0	45.0	30.0
4,6-DN-2-MF	16.0	6.0	14.0	10.0	12.0	7.0	21.0	17.0	19.0	19.0
2,4-DN-6-SBF	61.0	7.0	46.0	8.0	56.0	15.0	85.0	4.0	50.0	50.0

R = retención, E = elución

También se hizo un estudio de los porcentajes de recuperación obtenidos utilizando diferentes concentraciones de la disolución de nitrato de hierro (III).

En la tabla 34 se puede observar la concentración de los nitrofenoles y el porcentaje de recuperación obtenido, verificándose que la concentración óptima de la disolución de nitrato de hierro (III) para un mejor acondicionamiento de la columna es 20 mM. Se observa que una concentración mayor de nitrato de hierro (III) no mejora los resultados, posiblemente porque ya se ha saturado la oxina de hierro.

Tabla 34. Optimización de la concentración de nitrato de hierro (III).

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal (elución) = 1.0 mL/min

Vi = 10.0 mL

Vf = 2.0 mL

Nitrato de hierro (III)	2-Nitrofenol		4,6-Dinitro-2-metilfenol		2,4-Dinitro-6-secbutilfenol	
	C, mg/L	R, %	C, mg/L	R, %	C, mg/L	R, %
10 mM	1.59	46.0	1.87	12.0	1.53	50.0
15 mM	1.60	47.0	1.87	12.0	1.55	57.0
20 mM	1.63	50.0	1.88	33.0	1.53	80.0
30 mM	1.63	49.0	1.88	31.0	1.54	79.0

C = concentración, R = recuperación

Se hizo un estudio de recuperación para mezclas de nitrofenoles en diferentes condiciones. La concentración de cada nitrofenol en la mezcla fue de 1.6 mg/L. Se pasaron por la columna de oxina inmovilizada en CPG, 10.0 mL de mezclas de nitrofenoles, a un caudal de 1.0 mL/min. En la tabla 35 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 35. Estudio de la recuperación de mezclas de nitrofenoles

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5mm)

Caudal (retención) = 1.0 mL/min

Caudal (elución) = 1.0 mL/min

Vi = 10.0 mL

Vf = 2.0 mL

	2-Nitrofenol	4,6-Dinitro-2-metilfenol	2,4-Dinitro-6-secbutilfenol
Disoluciones de acondicionamiento	Recuperación, %	Recuperación, %	Recuperación, %
10.0 mL HCl 0.1 M Fe (III) 20 mM	32.0	10.0	21.0
10.0 mL HCl 0.2 M Fe (III) 20 mM	27.0	12.0	12.0
10.0 mL HCl 0.4 M Fe (III) 20 mM	35.0	12.0	23.0
10.0 mL HCl 0.1 M Fe (III) 20 mM	32.0	7.0	29.0
Fe (III) 10 mM	29.0	6.0	22.0
Fe (III) 20 mM	34.0	8.0	24.0
Fe (III) 30 mM	17.0	6.0	1.0

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente se decidió estudiar conjuntamente el 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol y el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol separando de los mismos ya que se comportan de forma distinta en los diferentes acondicionamientos. Se estudian por separado por la necesidad de acondicionar de forma distinta no por el hierro (III) sino por el HCl.

5.10.1.1. Estudio del acondicionamiento de la columna oxina – CPG para la preconcentración del 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol.

Para este estudio se utilizaron diferentes disoluciones para el acondicionamiento de la columna. En todos los casos se pasaron por la columna oxina – CPG 10.0 mL de la mezcla de 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol a un caudal de 1.0 mL/min. La elución se llevó a cabo con la fase móvil MeOH: 30 mM HCOOH/NaCOOH (65:35), pH 4.2 a un caudal de 0.6 mL/min, que ha sido utilizada en la separación cromatográfica por HPLC.

En la tabla 36 se presentan la concentración puesta y el porcentaje de recuperación para los nitrofenoles.

Tabla 36. Estudio del acondicionamiento de la columna oxina – CPG

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal (retención) = 1.0 mL/min; Caudal (elución) = 0.6 mL/min

$V_i = 10.0$ mL; $V_f = 2.0$ mL

Disoluciones de acondicionamiento	2-Nitrofenol		4,6-Dinitro-2-metilfenol	
	C, mg/L	R, %	C, mg/L	R, %
10.0 mL CH ₃ CN 10.0 mL HCl 0.1 M 10.0 mL de 10 mM de nitrato de hierro (III)	1.57	50.0	1.87	4.0
10.0 mL CH ₃ CN 10.0 mL HCl 0.4 M 10.0 mL de 20 mM de nitrato de hierro (III)	1.59	50.0	1.79	10.0
10.0 mL CH ₃ CN 10.0 mL HCl 0.1 M 5.0 mL HCl 0.4 M 10.0 mL de 20 mM de nitrato de hierro (III)	1.57	64.0	1.87	35.0

C= concentración

R = recuperación

Se observa que el máximo porcentaje de recuperación obtenido para el 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol fue con las disoluciones de acondicionamiento 10.0 mL de CH₃CN, 10.0 mL de HCl 0.1 M, 5.0 mL de HCl 0.4 M y 10.0 mL de una disolución 20 mM de nitrato de hierro (III). Esto justifica la necesidad de un medio fuertemente ácido que permita protonar los silanoles libres del vidrio y que no se produzcan repulsiones electrostáticas de estos silanoles con el 2-nitrofenol y el 4,6-dinitro-2-metilfenol.

5.10.1.2. Estudio del acondicionamiento de la columna oxina – CPG para la preconcentración del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.

Se utilizaron para este estudio diferentes disoluciones para el acondicionamiento de la columna oxina – CPG. Se pasan por la columna 10.0 mL de una disolución de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, a un caudal de 1.0 mL/min. La elución se lleva a cabo con la fase móvil MeOH: 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2, la misma que se utiliza en la separación por HPLC.

En la tabla 37 se muestran la concentración puesta y la recuperación para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. Se observa que para todos acondicionamientos los porcentajes de recuperación son elevados, principalmente cuando se compara con los valores obtenidos para el 2-nitrofenol y 4,6-dinitro-2-metilfenol en la tabla 36. Se verifica en este estudio que el porcentaje máximo (100%) de recuperación para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol fue con la disolución de acondicionamiento de 10.0 mL de CH₃CN, 10.0 mL de 20 mM de nitrato de hierro (III), sin acondicionamiento previo con una disolución ácida. En el caso del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol parece ser que este tipo de interacciones electrostáticas tienen menos importancia debido a que el fenol es mucho más grande y no se aproxima tanto al interior del poro del vidrio.

Tabla 37. Estudio del acondicionamiento de la columna oxina – CPG para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal (retención) = 1.0 mL/min

Caudal (elución) = 0.6 mL/min

V_i = 10.0 mL

V_f = 2.0 mL

Disoluciones de acondicionamiento	Concentración, mg/L	Recuperación, %
10.0 mL CH ₃ CN 10.0 mL HCl 0.1 M 10.0 mL de 20 mM de nitrato de hierro (III)	1.75	85.0
5.0 mL CH ₃ CN 10.0 mL de 20 mM de nitrato de hierro (III)	1.71	93.0
10.0 mL CH ₃ CN 10.0 mL de 20 mM de nitrato de hierro (III)	1.71	100

5.10.2. Evaluación del volumen de ruptura.

Para este estudio se eligió el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, pues de los tres nitrofenoles considerados es el que presenta mayor porcentaje de retención y recuperación.

El volumen de ruptura hace referencia a la cantidad de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol que se puede preconcentrar y recuperar en volúmenes crecientes de disolución, hasta llegar a un volumen donde dejan de ser constantes los datos de recuperación.

Para esto se pasaron a través de la columna oxina – CPG 10.0 µg de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en 10.0 mL, 25.0 mL, 50.0 mL y 100 mL, cada vez, a un caudal de 1.0 mL/min.

Una vez retenido el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, se eluye con la fase móvil MeOH; 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35). Se recogieron fracciones de 2.0 mL cada una y se analizaron por HPLC.

El área obtenida se lleva al calibrado del apartado 5.9.2.1. y se calcula la concentración.

En la tabla 38 y en la figura 21 se presentan los resultados obtenidos y se puede observar que las recuperaciones del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol para 10.0, 25.0 y 50.0 mL son muy buenas, sin embargo, a partir de 50.0 mL, los datos de recuperación dejan de ser reproducibles y se produce un gran descenso en la recuperación. Este estudio permite establecer un factor de preconcentración de 25 veces.

Tabla 38. Estudio del volumen de ruptura del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.

Columna oxina-CPG (10 mm x 2.5 mm)

Caudal (elución) = 1.0 mL/min

Volumen, mL	Recuperación, %
10.0	93.0
25.0	88.0
50.0	82.0
100	27.0

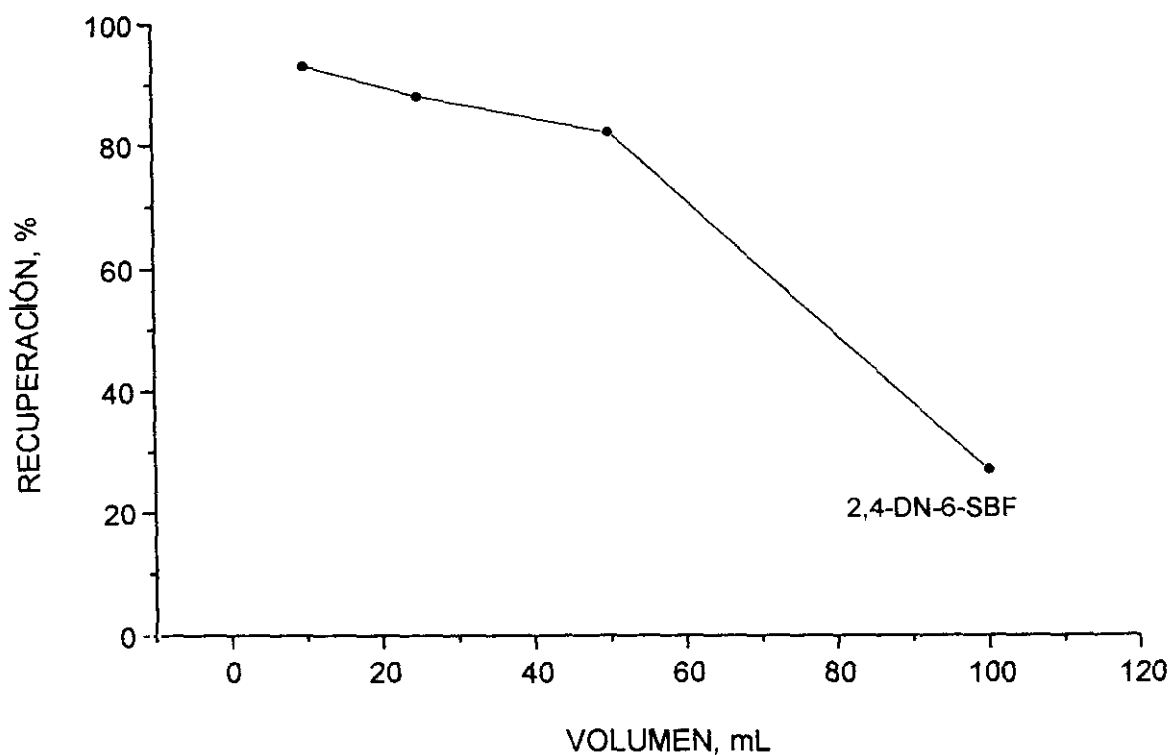


Figura 21. Determinación del volumen de ruptura para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol

5.10.3. Estudio de la influencia de la concentración

La influencia de la concentración se refiere a la cantidad máxima que se puede preconcentrar y recuperar en un volumen constante de disolución, hasta llegar a una cantidad donde dejan de ser constantes los datos de recuperación.

Para este estudio se pasaron a través de la columna oxina – CPG, 10.0 mL de la disolución de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en concentraciones de 0.8 a 6.0 mg/L cada vez. Después de retenido el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, se eluye con la

fase móvil MeOH: 30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 a un caudal de 1.0 mL/min y se recogieron fracciones de 2.0 mL, analizándose por HPLC. El área obtenida se llevó al calibrado del apartado 5.9.2.1, donde se calcula la concentración.

En la tabla 39 y en la figura 22 se presentan los resultados obtenidos, donde se puede observar la recuperación del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en función de la concentración, siendo la capacidad de la columna de 0.4 mg/g oxina – CPG. A partir de esta concentración la columna oxina – CPG de dimensiones 20.0 mm x 2.5 mm se ha saturado y ha perdido la capacidad de retención.

Tabla 39. Estudio de la influencia de la concentración para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.

Columna oxina-CPG (20 mm x 2.5 mm)

Caudal (elución) = 1.0 mL/min

V_i = 10.0 mL

V_f = 2.0 mL

Concentración, mg/L	Recuperación, %
0.8	78.0
2.0	82.0
3.0	85.0
4.0	92.0
5.0	40.0
6.0	19.0

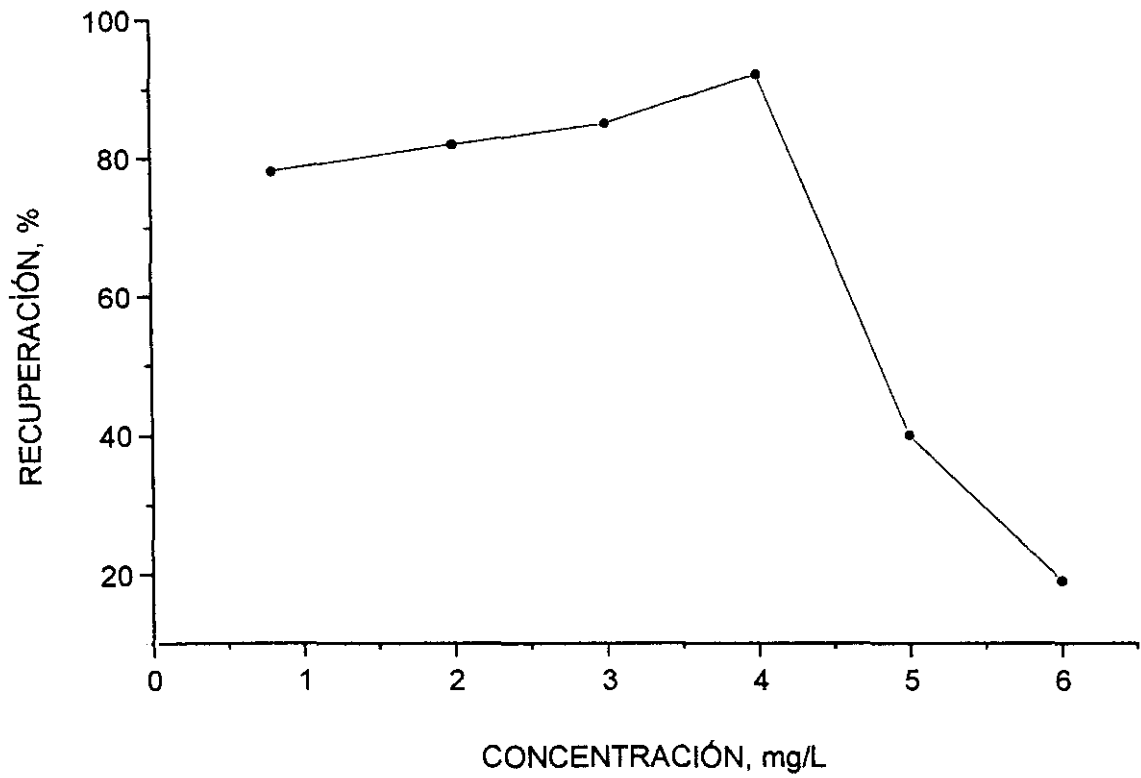


Figura 22. Estudio de la influencia de la concentración para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.

5.11. ESTUDIO CONJUNTO DE CLOROFENOLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)

Teniendo en cuenta que en muestras de interés medioambiental la cantidad de clorofenoles se encuentra en concentraciones por debajo del límite de detección de la mayoría de los métodos analíticos utilizados, es necesario una etapa de preconcentración antes de la determinación cromatográfica. Para esto se hizo un estudio conjunto de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, que a su vez permite la identificación de estos compuestos en muestras complejas.

5.11.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

Para el estudio conjunto de clorofenoles por cromatografía de gases/espectrometría de masas se establecieron las condiciones óptimas de trabajo para la determinación de estos compuestos en lo que se refiere a temperatura del inyector, el gradiente de temperatura, patrón interno y relaciones masa/carga para el modo de detección de iones seleccionados.

5.11.1.1. Elección del patrón interno

Para la elección del patrón interno se registraron cromatogramas de masas en el modo de iones seleccionados (SIM) para una mezcla de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, incluyendo uno de los dos compuestos 2,4,6-tribromofenol o 4,4'-diclorobifenilo, con la finalidad de usarlos como patrón interno.

Se observaron en los cromatogramas de masas que el pico del 4,4'-diclorobifenilo solapaba con los de los clorofenoles. Se decidió entonces utilizar el 2,4,6-tribromofenol, como patrón interno pues en las condiciones experimentales

establecidas se consiguió la separación de los tres clorofenoles y la del patrón interno. La elución se produjo en la siguiente orden: 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4,6-tribromofenol (patrón interno) y pentaclorofenol.

5.11.1.2. Elección de las condiciones cromatográficas

Para establecer las condiciones cromatográficas inicialmente se obtuvieron los espectros de masas de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol y del patrón interno 2,4,6-tribromofenol, los cuales se muestran en las figuras de 23 a 26.

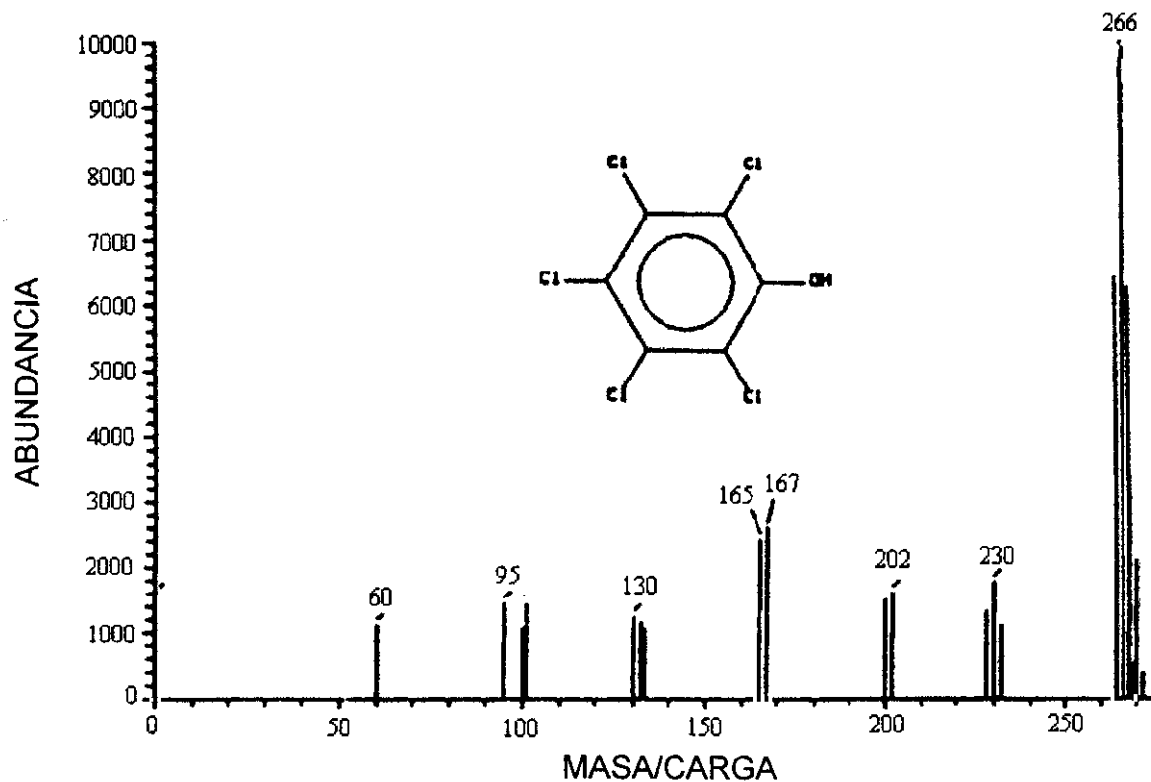


Figura 23. Espectro de masas del pentaclorofenol

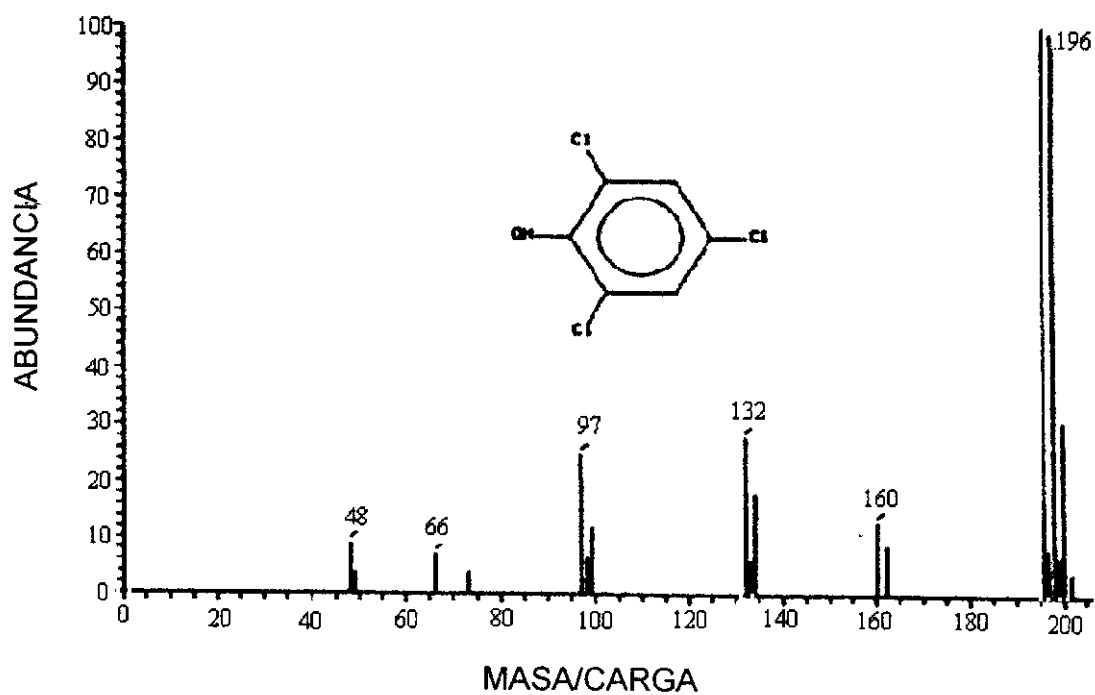


Figura 24. Espectro de masas del 2,4,6-triclorofenol

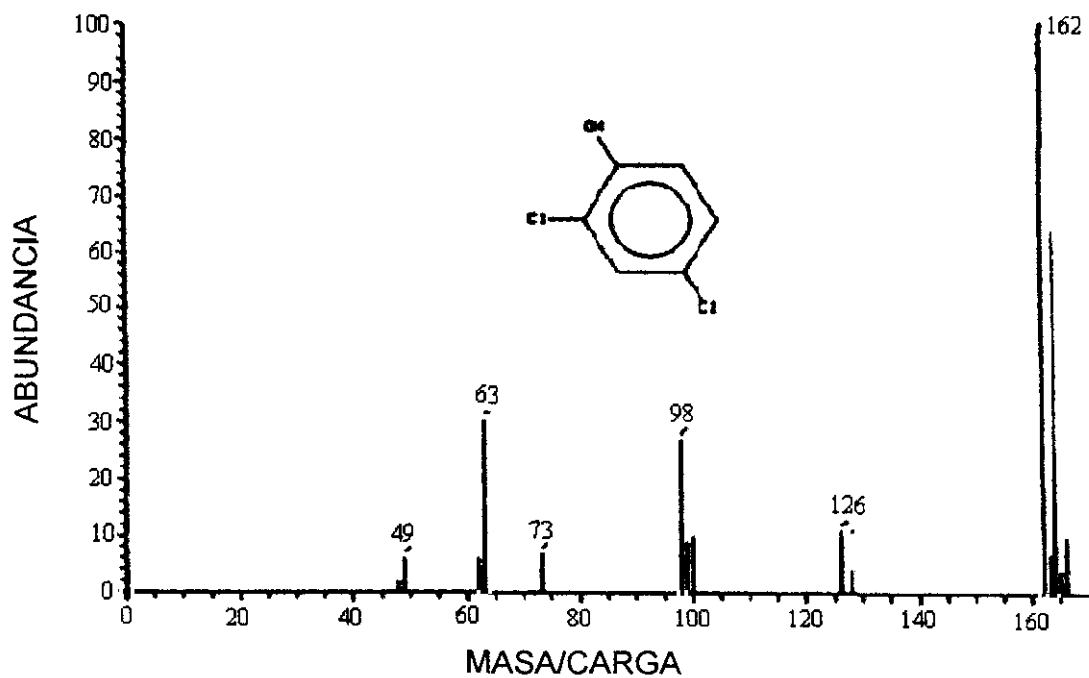


Figura 25. Espectro de masas del 2,4-diclorofenol

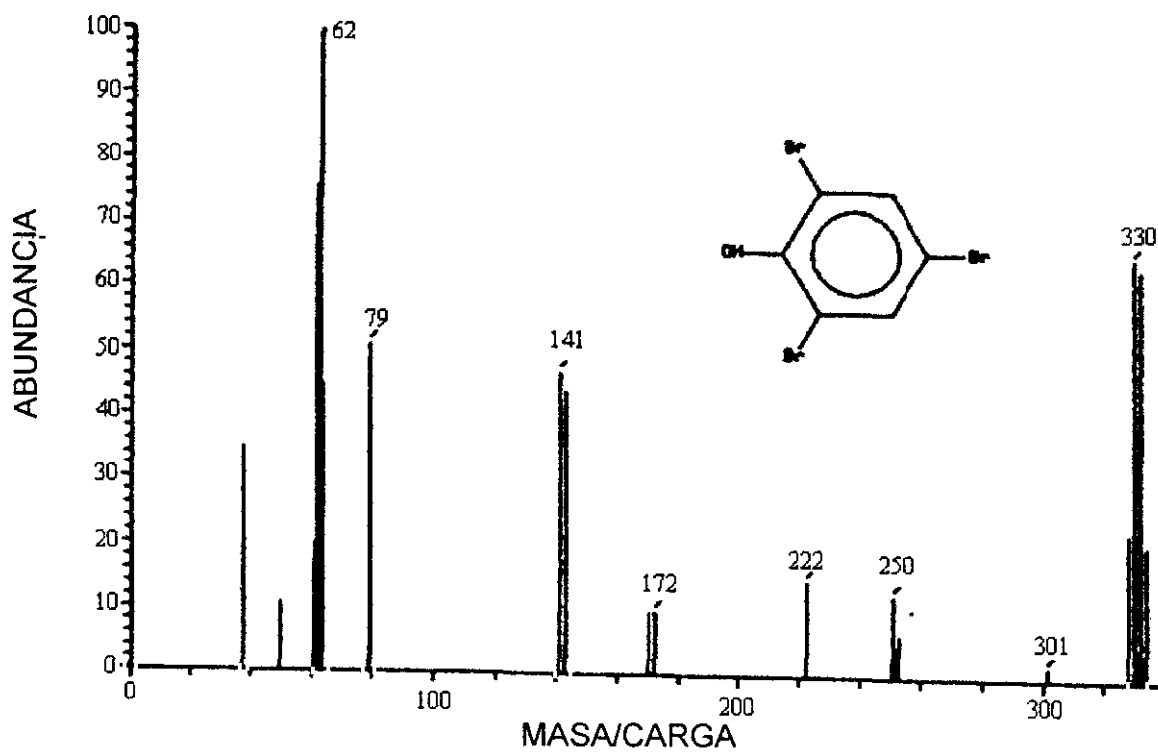


Figura 26. Espectro de masas del 2,4,6-tribromofenol

Posteriormente, se registraron los cromatogramas de iones totales (TIC) de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, utilizando como patrón interno el 2,4,6-tribromofenol y una columna PTE-5 (95% dimetil – 5% difenilpolisiloxano). Se inyectaron 3 μL de la mezcla de clorofenoles y se optimizaron las variables temperatura del inyector y gradiente de temperatura.

En la tabla 40 se muestran los intervalos estudiados y el valor óptimo seleccionado.

Tabla 40. Optimización de temperaturas en la separación cromatográfica.
Columna PTE – 5 (95% dimetil – 5% difenilpolisiloxano)

Variables	Intervalo Estudiado	Óptimo
Temperatura del Inyector, °C	250 - 320	300
Gradiente de Temperatura, °C	40 – 230	40 - 230
	80 – 280	
	50 – 300	
	40 – 200	
	50 - 250	

Las condiciones óptimas de trabajo seleccionadas fueron una temperatura inicial de 40°C durante 1 minuto y seguidamente a 20°C/min, hasta 230°C durante 5 minutos. La temperatura de inyector se fijó a 300°C y del detector a 250°C, utilizando helio como gas portador.

En la figura 27 se muestra un cromatograma de masas obtenido en estas condiciones.

El tiempo de retención de cada clorofenol se evaluó utilizando detección de iones totales y la asignación de cada pico se realizó por comparación del espectro de masas en la zona del máximo del pico con los datos de la librería Willey.

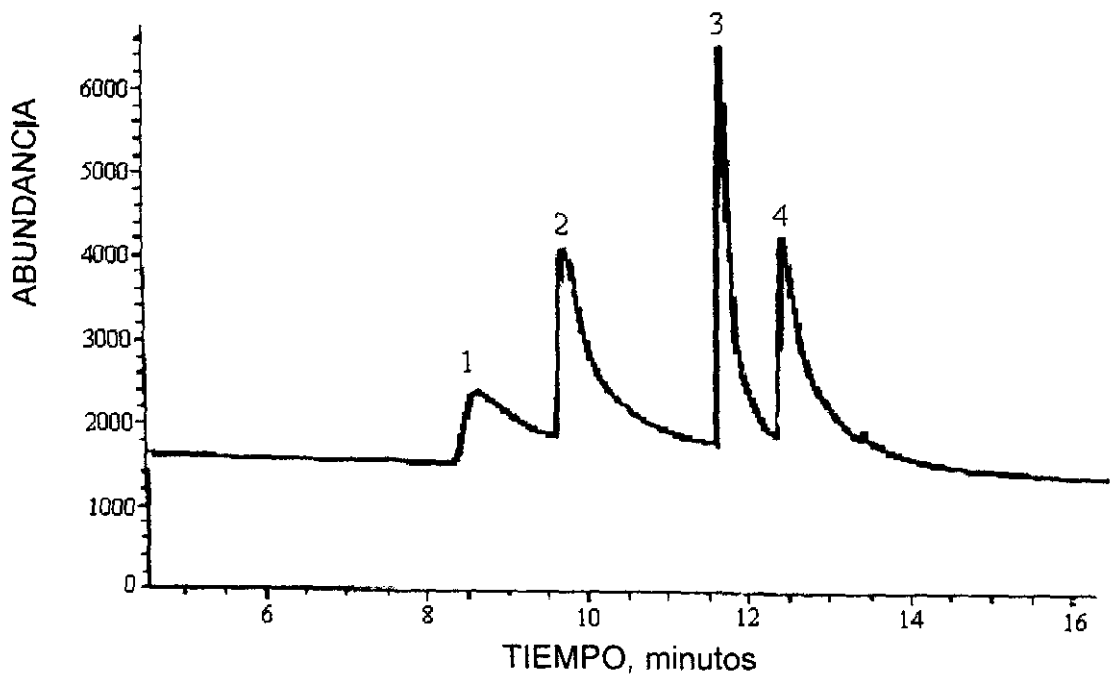


Figura 27. Cromatograma de iones totales de una mezcla de clorofenoles 1: 2,4-DCF = 10 mg/L, 2: 2,4,6-TCF = 5 mg/L, 3: 2,4,6-TBF = 15 mg/L, 4: PCF = 20 mg/L

5.11.1.3. Elección de las relaciones masa/carga (m/z) para el modo de detección de iones seleccionados (SIM)

Para elegir las relaciones masa/carga utilizadas en la detección se estudiaron los espectros de masas de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-tribromofenol.

Las relaciones masa/carga elegidas para cada compuesto son aquellas que tienen mayor abundancia para cada compuesto y cuyos valores se presentan en la tabla 41.

Tabla 41. Relaciones masa/carga elegidas para la detección de iones seleccionados (SIM)

Fenoles	Relación m/z
Pentaclorofenol	264
2,4,6-Triclorofenol	196
2,4-Diclorofenol	162
2,4,6-Tribromofenol	330

5.11.2. Características analíticas de la determinación de clorofenoles por GC/MS

5.11.2.1. Calibrado de los clorofenoles

De acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.9., se hicieron los calibrados del pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, usando como patrón interno 2,4,6-tribromofenol.

Analizando cada disolución del calibrado, se calcula el factor de respuesta (R_f) según la expresión:

$$R_f = \frac{A_F \cdot C_{PI}}{A_{PI} \cdot C_F}$$

Donde:

A_F = área del fenol;

C_{PI} = concentración del patrón interno

A_{PI} = área del patrón interno

C_F = concentración del fenol

Los cálculos del factor de respuesta (R_f) para los clorofenoles, usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno se presentan en las tablas 42 a 44.

Tabla 42. Cálculo del factor de respuesta (R_f) para el pentaclorofenol usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno (PI)

N°	A_F	C_{PI} , mg/L	A_{PI}	C_F , mg/L	R_f
1	450832	12.0	2131780	7.0	0.36
2	574105	12.0	2314980	8.0	0.37
3	723898	12.0	2187960	12.0	0.33
4	1171020	12.0	2326940	15.0	0.40

$R_{f \text{ medio}} = 0.36$
 $S_{r-1} = 0.028$
 $S_{r\%} = 7.8$

A_F = área del pentaclorofenol

C_{PI} = concentración del 2,4,6-tribromofenol

A_{PI} = área del 2,4,6-tribromofenol

C_F = concentración del pentaclorofenol

Tabla 43. Cálculo del factor de respuesta (R_f) para el 2,4,6-triclorofenol usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno (PI)

N°	A_F	C_{PI} , mg/L	A_{PI}	C_F , mg/L	R_f
1	353280	12.0	2314980	1.0	1.83
2	567875	12.0	2131780	2.0	1.59
3	1341540	12.0	2606350	4.0	1.54
4	1906100	12.0	2326940	5.0	1.96
					$R_{f \text{ medio}} = 1.73$
					$S_{n-1} = 0.20$
					$S_{r\%} = 11.5$

A_F = área del 2,4,6-triclorofenol

C_{PI} = concentración del 2,4,6-tribromofenol

A_{PI} = área del 2,4,6-tribromofenol

C_F = concentración del 2,4,6-triclorofenol

Tabla 44. Cálculo del factor de respuesta (R_f) para el 2,4-diclorofenol usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno (PI)

N°	A_F	C_{PI} , mg/L	A_{PI}	C_F , mg/L	R_f
1	1183350	12.0	2314980	5.0	1.23
2	1572850	12.0	2131780	7.0	1.26
3	2088690	12.0	2187960	9.0	1.27
4	3298470	12.0	2326940	12.0	1.41
					$R_{f \text{ medio}} = 1.30$
					$S_{n-1} = 0.080$
					$S_{r\%} = 6.20$

A_F = área del 2,4-diclorofenol

C_{PI} = concentración del 2,4,6-tribromofenol

A_{PI} = área del 2,4,6-tribromofenol

C_F = concentración del 2,4-diclorofenol

Como se puede observar los resultados obtenidos tienen desviaciones estándar relativas entre 6.2 % y 11.5 %, siendo estos valores aceptables, ya que están de acuerdo con las recomendaciones de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA), que considera que el factor de respuesta (R_f) permanece constante, si la desviación estándar relativa es menor del 20.0 %; de esta forma el valor de R_f se utiliza para el cálculo de las concentraciones en la muestra.

En la figura 28 se presenta un cromatograma de masas de una mezcla de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, usando como patrón interno el 2,4,6-tribromofenol, de uno de los puntos del calibrado.

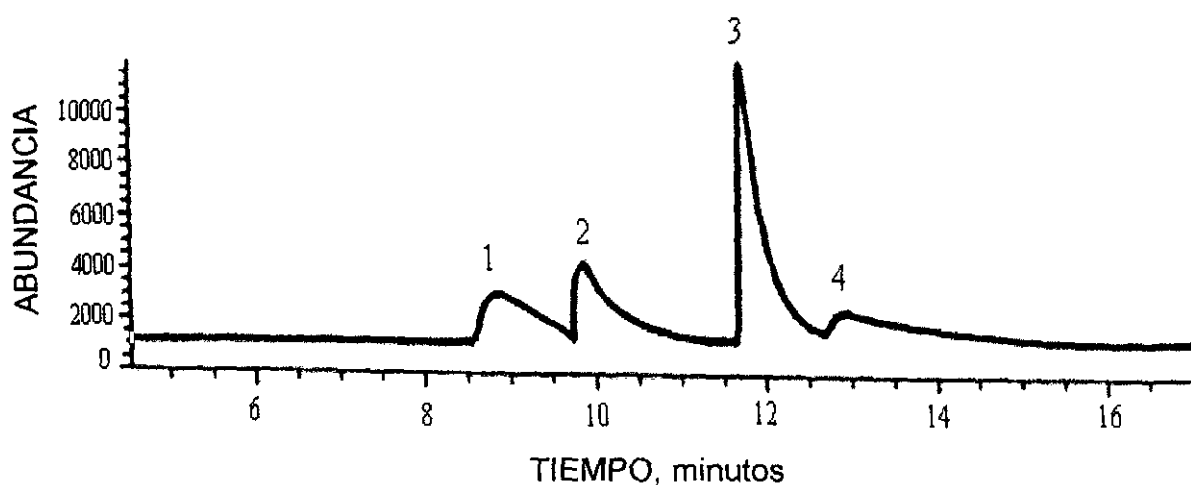


Figura 28. Cromatograma de iones totales de una mezcla de clorofenoles 1: 2,4-DCF = 7 mg/L; 2: 2,4,6-TCF = 4 mg/L, 3: 2,4,6-TBF = 12 mg/L; 4: PCF = 12 mg/L

En la tabla 45 se presentan los tiempos de retención y factores de capacidad para una mezcla de clorofenoles usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno.

Tabla 45. Tiempo de retención y factores de capacidad de los clorofenoles.

Clorofenoles	Tiempo de retención, min	Factor de capacidad, k
2,4-Diclorofenol	8.77	0.03
2,4,6-Triclorofenol	9.82	0.15
2,4,6-Tribromofenol	11.78	0.38
Pentaclorofenol	12.85	0.51

5.11.2.2. Intervalo de linealidad

Se puede representar la relación del área del fenol (A_F) a la concentración del patrón interno (C_{PI}) por la área del patrón interno (A_{PI}) frente a concentración del fenol (C_F), obteniendo una representación lineal. Las ecuaciones correspondientes al calibrado de cada clorofenol se presentan en la tabla 46 usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno.

Tabla 46. Rango de linealidad y ecuaciones de las líneas de calibrado de clorofenoles usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno (PI).

N°	A _F C _{PI} /A _{PI}			C _F , mg/L			Ecuaciones de las líneas de calibrado			
	PCF	2,4,6-TCF	2,4-DCF	PCF	2,4,6-TCF	2,4-DCF		PCF	2,4,6-TCF	2,4-DCF
1	2.538	1.831	6.134	7.0	1.0	5.0	Ordenada en el origen	- 0.4235	- 0.435	- 1.887
2	2.976	3.197	8.854	8.0	2.0	7.0				
3	3.970	6.177	11.456	12.0	4.0	9.0	Pendiente	0.41	1.90	1.55
4	6.039	9.830	17.010	15.0	5.0	12.0	Coefficiente de correlación, r	0.9723	0.9769	0.9958

5.11.2.3. Límite de detección y cuantificación

Con relación al límite de detección (L.D.) la mayor sensibilidad se obtiene para el 2,4,6-triclorofenol cuyo límite de detección es de 0.5 mg/L, mientras que el pentaclorofenol presenta el límite de detección más alto con un valor de 2.0 mg/L. El límite de cuantificación (L.C.) para el 2,4,6-triclorofenol fue él más bajo 1.0 mg/L y más alto para el pentaclorofenol 6.0 mg/L.

En la tabla 47 se presentan los límites de detección y cuantificación de los clorofenoles por GC/MS.

Tabla 47. Límite de detección y cuantificación para los clorofenoles.

Clorofenoles	L. D., mg/L	L. C., mg/L
Pentaclorofenol	2.0	6.0
2,4,6-Triclorofenol	0.5	1.0
2,4-Diclorofenol	1.0	3.0

5.12. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE CLOROFENOLES Y DETERMINACIÓN POR GC/MS

5.12.1. Estudio de la preconcentración selectiva de clorofenoles y determinación por GC/MS

Para la preconcentración selectiva de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol se siguió el procedimiento descrito en el apartado 4.3.10. En la tabla 48 se presentan los resultados obtenidos para la mezcla de clorofenoles.

Tabla 48. Estudio de la recuperación de clorofenoles.

Clorofenoles	Puesto, μg	Encontrado, μg	Recuperación*, %	S_{n-1}
Pentaclorofenol	90	80	88.8	0.95
2,4,6-Triclorofenol	30	9	30.0	0.10
2,4-Diclorofenol	70	21	30.0	0.53

* media de 3 experimentos

Observando la tabla 48 puede apreciarse que los porcentajes de recuperación obtenidos para el pentaclorofenol y 2,4-diclorofenol no son muy diferentes comparándose estos valores con los obtenidos por HPLC. Sin embargo, el porcentaje de recuperación para el 2,4,6-triclorofenol es baja. Se decidió estudiar la recuperación de 2,4,6-triclorofenol en muestras a las que se les había añadido de 50 μg ó 100 μg .

En la tabla 49 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos, observándose 46.0% de recuperación para la muestra de 50 μg de 2,4,6-triclorofenol, sin embargo este porcentaje continua siendo más bajo que el obtenido por HPLC.

Utilizándose el diclorometano como eluyente, en el proceso de concentración, la recuperación es menor que cuando se usa acetonitrilo y se determina los clorofenoles por HPLC.

Tabla 49. Estudio de la recuperación del 2,4,6-triclorofenol.

Puesto, μg	Encontrado, μg	Recuperación*, %	S_{n-1}
50	23	46.0	0.34
100	24	24.0	0.15

* media de 3 experimentos

5.12.2. Evaluación del volumen de ruptura

Para realizar el estudio del volumen de ruptura de los clorofenoles, se pasaron a través de la columna oxina – CPG (20 mm x 2.5 mm), 70 μg de 2,4-diclorofenol, 30 μg de 2,4,6-triclorofenol y 90 μg de pentaclorofenol, en 10.0 mL, 25.0 mL y 50.0 mL, cada vez a un caudal de 1.0 mL/min. Después de retenido la mezcla de clorofenoles para cada volumen, se hizo la elución con diclorometano a un caudal de 1.0 mL/min, se añade el patrón interno 2,4,6-tribromofenol y se lleva a un volumen de 10.0 mL. La recuperación de los clorofenoles se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 4.3.10.

En la tabla 50 y en la figura 29 se muestran los resultados obtenidos y se puede observar que el volumen de ruptura está en torno a 10.0 mL, ya que para

25.0 mL la recuperación deja de ser constante y se produce un gran descenso en la recuperación, principalmente del pentaclorofenol.

Tabla 50. Determinación del volumen de ruptura de clorofenoles.

Vo, mL	10.0		25.0		50.0	
	C, µg	C/Co	C, µg	C/Co	C, µg	C/Co
Pentaclorofenol	66.40	0.73	43.2	0.48	25.2	0.28
2,4,6-Triclorofenol	4.83	0.16	4.0	0.13	3.78	0.12
2,4-Diclorofenol	14.80	0.21	13.9	0.20	12.5	0.18

Co: pentaclorofenol = 90 µg, 2,4,6-triclorofenol = 30 µg, 2,4-diclorofenol = 70 µg

C = µg (recuperado)

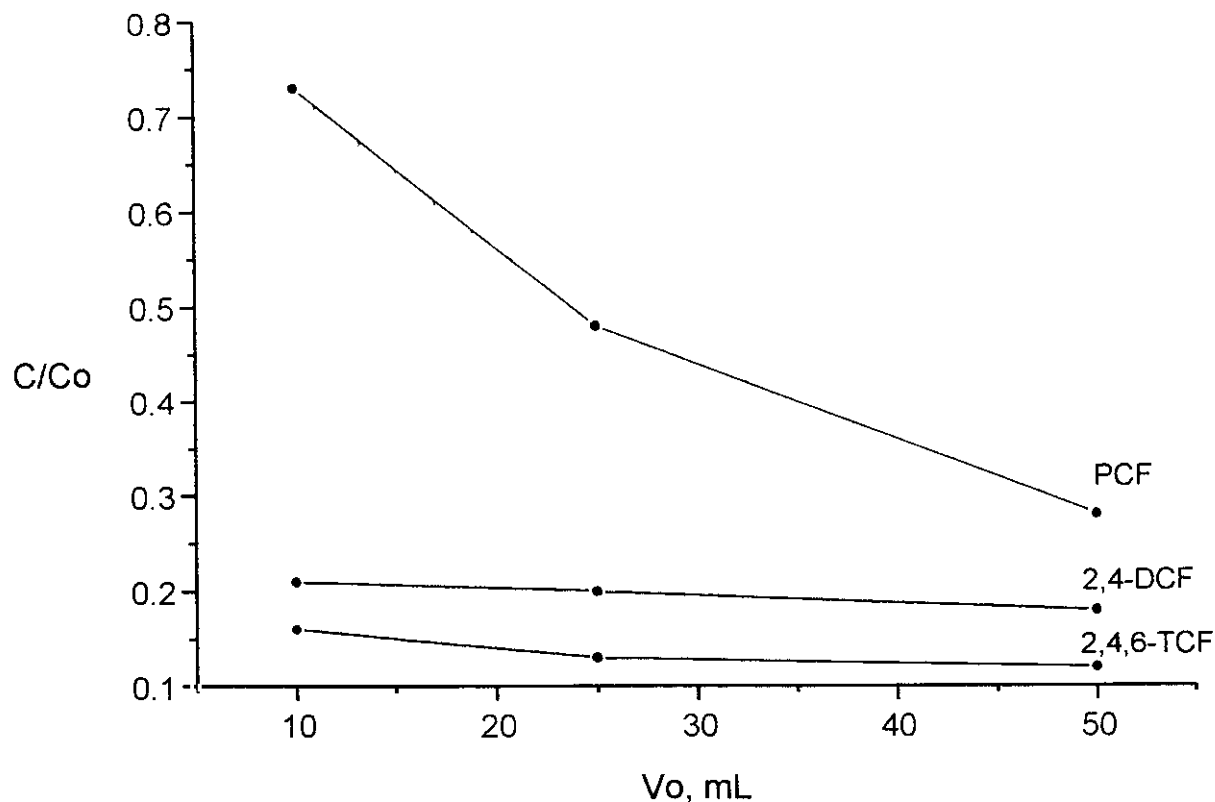


Figura 29. Determinación del volumen de ruptura.

PCF = pentaclorofenol, 2,4,6-TCF = 2,4,6-triclorofenol, 2,4-DCF = 2,4-diclorofenol

5.12.3. Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados del proceso de preconcentración y determinación se evaluó de acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.10. Se realizaron tres determinaciones para una mezcla de pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol, usando el 2,4,6-tribromofenol como patrón interno. Los experimentos se realizaron con la columna oxina – CPG (20 mm x 2.5 mm).

En la tabla 51 se presentan los valores obtenidos para la mezcla de clorofenoles.

Tabla 51. Reproducibilidad

Clorofenoles	Puesto, mg/L	Encontrado, mg/L			Media	S _{n-1}	S _r , %
		1	2	3			
Pentaclorofenol	9.0	8.9	7.0	8.1	8.0	0.95	12.0
2,4,6-Triclorofenol	3.0	0.8	1.0	0.9	0.9	0.10	11.0
2,4-Diclorofenol	7.0	2.5	1.5	2.3	2.1	0.53	25.0

5.13 DETERMINACIÓN DE FENOLES EN DIVERSAS MUESTRAS

5.13.1. Determinación de pentaclorofenol en madera de pino (serrín)

El uso de pentaclorofenol y sus sales en tratamientos protectores de la madera está regulado según la legislación española (214).

Se realizó un estudio de la extracción y recuperación de pentaclorofenol en madera de pino (serrín). De acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.11.1, se evaluó la recuperación según las condiciones del apartado 5.8.4.

5.13.1.1. Tratamiento de la muestra

La extracción de pentaclorofenol en madera se hace en medio alcalino. Se pesa 1.0 g de madera de pino (serrín) y se añaden 10.0 mL de la disolución de NaOH 0.5 M y agita durante algunos minutos. Después de un máximo de 24 horas, se filtra con un filtro de papel y se lava el serrín que queda en el filtro con dos porciones de 1.0 mL cada una de NaOH 0.5 M. Una vez filtrado y para asegurar pH ácido se añaden 3.0 mL de HCl 2 M y se filtra otra vez en papel para asegurar que la muestra este clara.

5.13.1.2. Estudio de recuperación

Se realizó un estudio de la recuperación del pentaclorofenol y su determinación por HPLC con detección a 240 nm, de acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.11.1.

Inicialmente se prepara la columna oxina – CPG con 10.0 mL de acetonitrilo y luego con 10.0 mL de HCl 0.1 M. A continuación se pasan entre 10.0 mL y 12.0 mL de la disolución ácida una vez extraída de la muestra de serrín a un caudal de 1.0 mL/min. Se recoge la fracción no retenida y se registra el cromatograma y se observa que la cantidad de pentaclorofenol no retenida esta por debajo del límite de cuantificación.

En la figura 30 se presenta el cromatograma de la fracción no retenida del pentaclorofenol en la muestra de serrín.

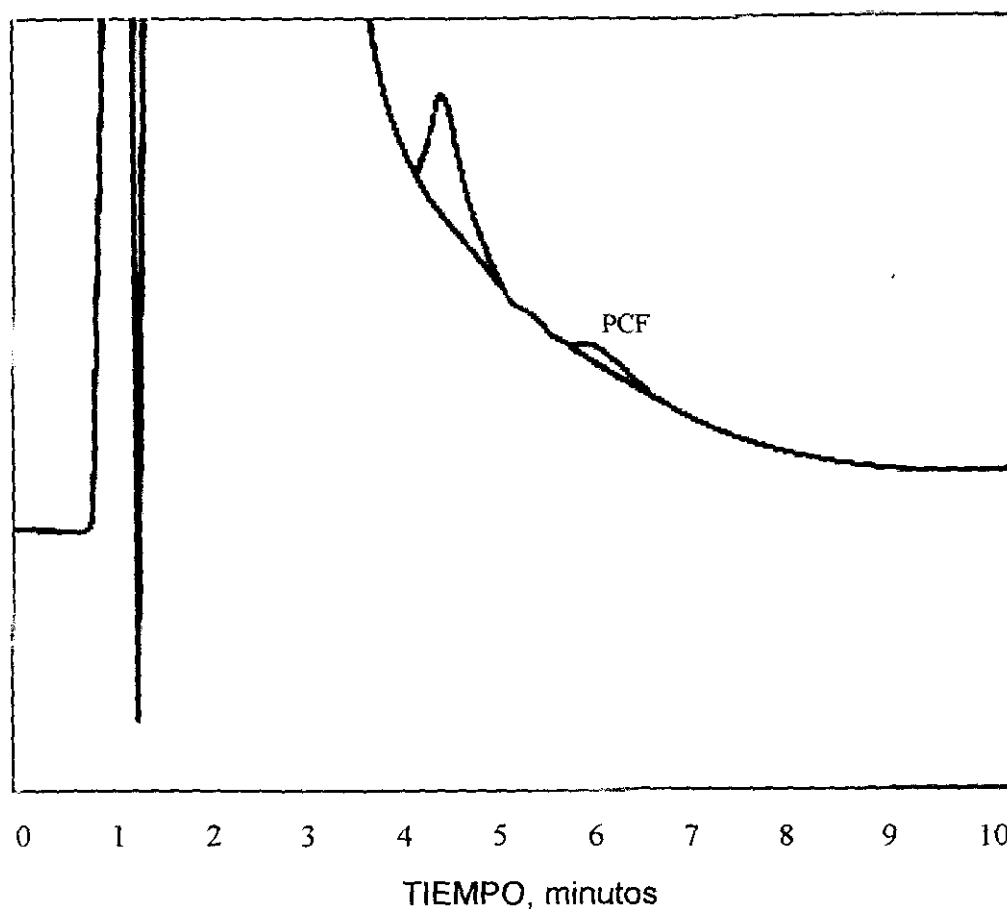


Figura 30. Cromatograma de una fracción no retenida de pentaclorofenol en muestra de serrín.

Columna Supercosil LC – 18 150 x 3.0 mm

Fase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min

Longitud de onda = 240 nm

A continuación se eluye el pentaclorofenol con 1.0 mL de acetonitrilo y no se observa pentaclorofenol en la muestra de serrín. Se procedió a la evaluación de la recuperación de pentaclorofenol haciendo diferentes adiciones sobre el serrín.

En la figura 31 se presentan el cromatograma de la muestra de serrín cuando se añaden 2.6 μg de pentaclorofenol, recuperándose 2.203 μg .

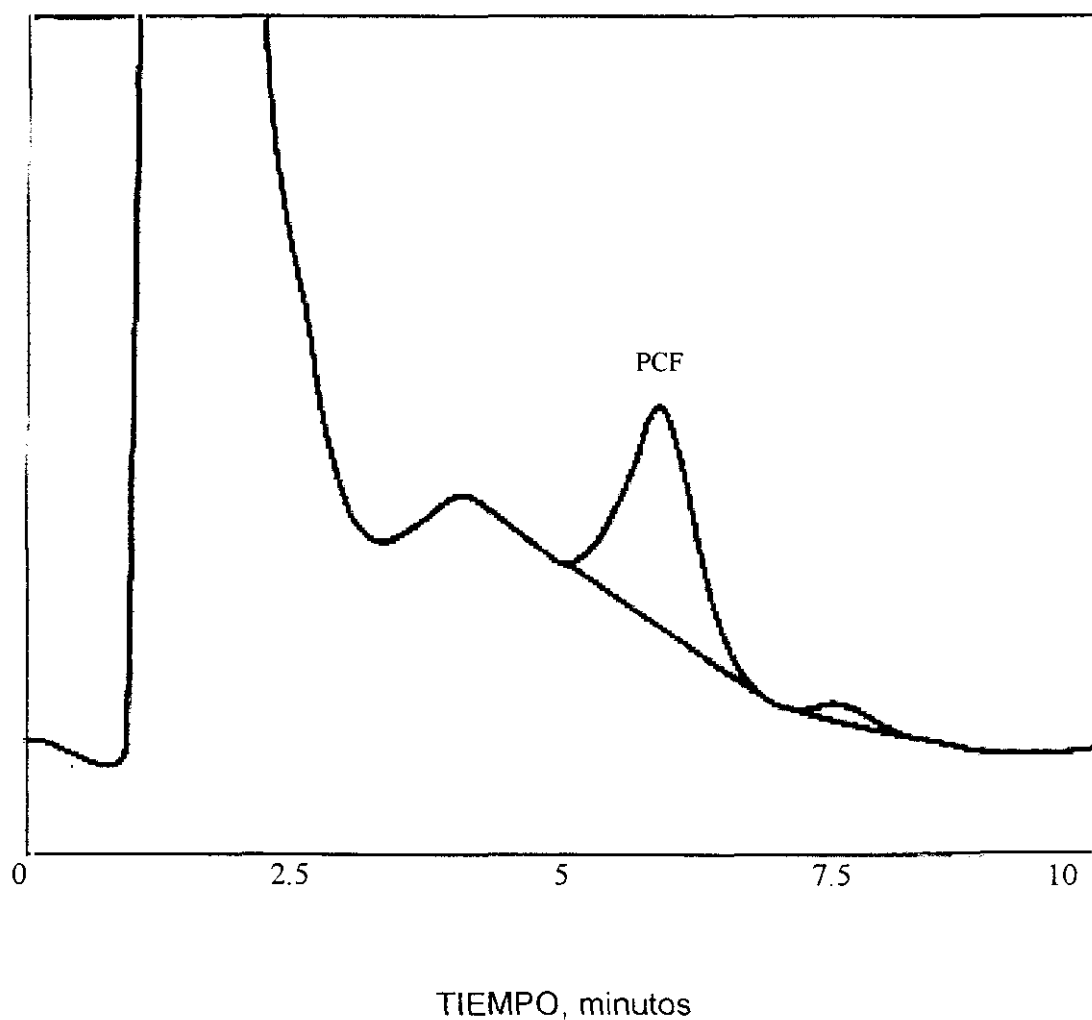


Figura 31. Cromatograma de la elución de una muestra de serrín con adición de 2.6 μg pentaclorofenol.

Columna Supercosil LC – 18 150 x 3.0 mm

Fase Móvil = MeOH : CH₃CN : 30 mM CH₃COONH₄, pH 5.1 (35:25:40)

Caudal = 1.0 mL/min; Longitud de onda = 240 nm

En la tabla 52 se presentan la recuperación de distintas muestras de serrín cuando se adicionan diferentes cantidades de pentaclorofenol.

Tabla 52. Determinación de pentaclorofenol en madera de pino (serrín).

Puesto, μg	Encontrado, μg	Recuperación, %
2.611	2.203	84.4
2.611	2.527	96.8
3.046	2.876	94.4
3.046	2.906	95.4
1.958	1.635	83.5
1.958	1.679	85.7
1.088	1.038	95.4
1.088	0.978	89.9
		Media = 91.0 %
		$S_{n-1} = 5.5$
		$S_r \% = 6.0$

5.13.2. Determinación de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (dinoseb) en zumo de limón

Se hizo un estudio de la recuperación de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol (dinoseb) en zumo de limón comercial de la marca Don Simón.

De acuerdo con el procedimiento del apartado 4.3.11.2 se pasaron por la columna oxina – CPG 10.0 mL y 25.0 mL de la muestra y se realizaron la recuperación en las condiciones óptimas que se indican en el apartado 5.9.1.

5.13.2.1. Tratamiento del zumo de limón

Inicialmente se acidifica la muestra de zumo de limón añadiendo 1.0 mL de HCl 1 M por cada 10.0 mL de muestra, ya que la especie que se retiene en la oxina es el fenol y no el fenóxido, por lo que debemos asegurar la presencia de esta especie en la muestra. Al añadir el ácido al zumo de limón, la muestra aumenta su turbidez. Con el objeto de eliminarla, se filtra la muestra con una membrana de 0.45 μm antes de pasarla por la columna oxina – CPG.

Teniendo en cuenta que los colorantes de zumo de limón también se retienen en la oxina, se intentó separarlos eluyendo con 1.0 mL de acetonitrilo. Sin embargo, lo que ocurrió, fue que el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol también se eluía en pequeña proporción con acetonitrilo.

Como las sustancias colorantes de zumo de limón que se eluían con la fase móvil no interferían en la determinación cromatográfica del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol, no se separaron previamente.

5.13.2.2. Estudio de recuperación del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol

Se hizo un estudio de la recuperación del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol y su determinación por HPLC con detección a 350 nm.

Para esto, se añadieron al zumo de limón de 1.0 a 2.0 μg de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol y se utilizó el procedimiento del apartado 4.3.11.2. para la determinación por HPLC, se usaron los procedimientos del apartado 4.3.7, recogiendo 2.0 mL del eluido. Las cantidades añadidas están en el entorno máximo establecido por la legislación (215).

En la tabla 53 se presentan los resultados obtenidos para cinco experimentos realizados.

Las recuperaciones en las muestras de zumo de limón están por encima del 80%, cuando se preconcentran 10.0 mL de muestra en la columna oxina – CPG, además, cuando se tratan 25.0 mL de muestra se consigue buena recuperación y se pueden determinar cantidades menores de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol.

Tabla 53. Determinación de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en zumo de limón.

Experimentos	Volumen, mL	Cantidad añadidos, μg	Cantidad recuperada, μg	Recuperación , %
1	10.0	2.00	1.61	80.0
2	10.0	2.00	1.93	97.0
3	10.0	0.86	0.84	98.0
4	10.0	1.40	1.34	96.0
5	25.0	1.23	1.23	100
				Media=94.4
				$S_{n-1} = 8.1$
				$S_r, \% = 8.6$

6. CONCLUSIONES

Inmovilización de la 8-hidroxiquinoleína (oxina) en vidrio de poro controlado (CPG)

1. - La cantidad de oxina inmovilizada covalentemente en vidrio de poro controlado oscila entre 101 y 157 mg por gramo de vidrio.
2. - El producto oxina-CPG mantiene su capacidad de retención de cloro- y nitrofenoles durante los cinco meses siguientes a su preparación, siempre que se mantenga almacenado en un lugar exento de humedad a temperatura ambiente.
3. - El producto oxina-CPG mantiene su capacidad de retención durante varios días cuando se utiliza para preconcentrar distintos fenoles en medio acuoso a pH 1.0. La cantidad de muestras preconcentradas en cada columna dependerá de la naturaleza del cloro- o nitrofenol.

Retención y elución de los fenoles contaminantes prioritarios sobre columnas rellenas de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG)

4. - Los fenoles contaminantes prioritarios se retienen en columnas de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado en medios ácidos, por lo que la especie retenida es el fenol y no el fenóxido. A medida que aumenta el pH, la retención es menor, debido a que la forma predominante en disolución es el fenóxido. Por otro lado, a pH alcalino se observa la hidrólisis de la unión entre la oxina y el vidrio diazotado.
5. - Para caudales de 0.6 y 1.0 mL/min, los fenoles más retenidos son el pentaclorofenol (98.8 %) y el 2,4,6-triclorofenol (73.2 %); de entre los nitrofenoles, el 2-nitrofenol (45.3 %); y metilfenoles, el 4-cloro-3-metilfenol (46.0%).

6. - En el caso de los clorofenoles, la retención en oxina-CPG aumenta con el grado de cloración y con el pKa; en los nitrofenoles, la retención no parece depender tanto de la acidez como de la posición que ocupe el grupo nitro, y parece estar favorecida cuando el grupo nitro está en posición orto. Los fenoles metilados, al tener sustituyentes donadores de electrones, presentan menor acidez y también menor retención en oxina inmovilizada, tal y como cabría esperar.

7.- El pentaclorofenol prácticamente no se retiene en la columna de oxina-CPG cuando está disuelto en disolventes como diclorometano, n-hexano o éter dietílico, los cuales podrían usarse como eluyentes dada la afinidad del pentaclorofenol por ellos.

8.- La estabilidad del pentaclorofenol retenido en la columna de oxina-CPG permite la conservación de bajas concentraciones de este fenol durante al menos cuatro días.

9. - La cantidad máxima de pentaclorofenol retenido es de unos 0.4 mg por gramo de oxina-CPG.

10. - Por lo que respecta a la reproducibilidad de la retención, no se observan diferencias significativas entre columnas, ya que la desviación estándar es del orden del 3.0% en una misma columna y del 4.0% para distintas columnas.

11. - La elución de los fenoles retenidos en la columna rellena de oxina-CPG es elevada cuando se realiza con acetonitrilo y mezclas acetonitrilo-agua. Sólo se pudo seguir espectrofotométricamente la elución del 2-nitrofenol, ya que, en el caso de los demás fenoles, el máximo de absorción está en el entorno de la absorción del disolvente y los resultados obtenidos fueron poco representativos. La elución del 2-nitrofenol fue del 39.5% a un caudal de 0.6 mL/min.

Determinación de clorofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

12. - Los espectros de absorción de los clorofenoles pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol presentan bandas de absorción en el intervalo 200 a 302 nm. La longitud de onda de compromiso para la determinación cromatográfica conjunta de estos clorofenoles fue de 240 nm.

13.- La separación cromatográfica se realizó a pH 5.1, ya que es el pH al cual la resolución es máxima con el menor tiempo de retención.

14. - La fase móvil elegida para la separación cromatográfica de los tres clorofenoles fue un compromiso entre adecuada resolución y tiempo mínimo de análisis. Los clorofenoles se separaron en un tiempo inferior a ocho minutos con la fase móvil MeOH:CH₃CN:30 mM CH₃ COONH₄ a pH 5.1 (35:25:40).

15. – El intervalo de linealidad para los calibrados fue de 1.5 a 4.5 mg/L para el pentaclorofenol, 0.5 a 3.5 mg/L para el 2,4,6-triclorofenol y 1.0 a 5.0 mg/L para el 2,4-diclorofenol, utilizando la columna Spherisorb 5 ODS 150 x 4.6 mm. También se hizo un calibrado para el pentaclorofenol de 0.07 a 8.0 mg/L con la columna Supercosil LC-18 150 x 3.0 mm, obteniéndose en todos los calibrados coeficientes de correlación (r) iguales o superiores a 0.9946.

16. - Los límites de detección de los clorofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia con detección espectrofotométrica fueron de 0.10 mg/L para el pentaclorofenol y 2,4,6-triclorofenol y de 0.20 mg/L para el 2,4-diclorofenol. Los límites de cuantificación fueron de 0.33 mg/L para pentaclorofenol y 2,4,6-triclorofenol y 0.67 mg/L para el 2,4-diclorofenol.

17. - La reproducibilidad del método cromatográfico, expresada como desviación estándar relativa está entre 3.5 y 5.3 %.

**Preconcentración selectiva de clorofenoles en columnas de oxina
inmovilizada en vidrio de poro controlado y determinación por
cromatografía líquida**

18. - Las máximas retenciones obtenidas para los clorofenoles cuando el proceso se sigue por HPLC fueron del 100% para el pentaclorofenol, 75.1% para el 2,4,6-triclorofenol y 45.1% para el 2,4-diclorofenol, siendo el caudal de 1.0 mL/min. Los máximos porcentajes de elución cuando ésta se lleva a cabo con acetonitrilo a un caudal de 0.6 mL/min fueron de 95.4 % para el pentaclorofenol, 66.0% para el 2,4,6-triclorofenol y 40.6% para el 2,4-diclorofenol.

19. - El volumen de ruptura de los clorofenoles cuando se preconcentran conjuntamente en la columna rellena con oxina-CPG fue de 50.0 mL para el pentaclorofenol y 2,4,6-triclorofenol y 25.0 mL para el 2,4-diclorofenol.

20. - El porcentaje de retención fue del 100% para el pentaclorofenol en concentraciones de 2.0, 3.0 y 4.0 mg/L, del 77.3% para 4.0 mg/L de 2,4,6-triclorofenol, y del 38.2% para 8.0 mg/L de 2,4-diclorofenol, cuando se utiliza una columna de 1.0 cm de longitud y 2.5 mm de diámetro interno.

21. La elución de pentaclorofenol en el mínimo volumen de acetonitrilo se realizó eluyendo el pentaclorofenol, previamente retenido en la columna rellena de oxina-CPG, con fracciones sucesivas de acetonitrilo. La primera fracción de 1.0 mL fue suficiente para recuperar el 87.0% del pentaclorofenol. La cantidad no retenida en la columna fue de 6.8%. Teniendo en cuenta que el volumen de ruptura para el pentaclorofenol es de 50.0 mL y que se eluye en un porcentaje muy alto con un mililitro, se alcanza un factor de preconcentración de 50.

**Determinación de nitrofenoles por cromatografía líquida de alta eficacia
(HPLC)**

22. - La longitud de onda de compromiso para la determinación cromatográfica de los nitrofenoles fue de 350 nm, ya que el 4,6-dinitro-2-metilfenol y 2,4-dinitro-6-secbutilfenol presentan bandas con máximos de absorción a 376 nm, y el 2-nitrofenol tiene su máximo a 346 nm.

23. - El pH de trabajo, 4.2, es un compromiso entre una buena resolución y un tiempo mínimo para el desarrollo del cromatograma.

24. - La fase móvil binaria elegida, MeOH:30 mM HCOOH/NaCOOH pH 4.2 (65:35), permite la separación de los tres nitrofenoles estudiados en un tiempo inferior a siete minutos.

25. - Los intervalos lineales de los calibrados fueron de 0.1 a 1.5 mg/L para el 2-nitrofenol, 0.05 a 1.0 mg/L para el 4,6-dinitro-2-metilfenol, y 0.3 a 1.0 mg/L para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. En todos los casos se han obtenido coeficientes de correlación de 0.980 o superiores.

26. - Los límites de detección fueron de 20 µg/L para el 2-nitrofenol, 10 µg/L para el 4,6-dinitro-2-metilfenol, y 60 µg/L para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol. Los límites de cuantificación fueron 67, 33 y 200 µg/L respectivamente.

27. - La reproducibilidad del método cromatográfico, expresada como desviación estándar relativa, está entre 1.0 y 1.5%.

**Preconcentración selectiva de nitrofenoles sobre columnas de oxina
inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG) y determinación
cromatográfica**

28. - Los nitrofenoles se retienen en la columna de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado en medios ácidos, por lo que la especie retenida es el fenol y no el fenóxido.

29. - Los nitrofenoles se retienen en columnas rellenas de oxina inmovilizada en vidrio de poro controlado acondicionadas con disoluciones de nitrato de hierro (III). La oxina forma con el hierro (III) una fase estacionaria que es selectiva hacia los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. La concentración de nitrato de hierro (III) óptima para el acondicionamiento de la columna oxina-CPG es de 20 mM.

30. - La retención de los nitrofenoles varía según el procedimiento de acondicionamiento utilizado. La preconcentración de 2,4-dinitro-6-secbutilfenol sólo necesita un acondicionamiento con una disolución 20 mM de nitrato de hierro (III), mientras que el 2-nitrofenol y el 4,6-dinitro-2-metilfenol requieren un preacondicionamiento con varias porciones de ácido clorhídrico a diferentes concentraciones antes del acondicionamiento con la disolución de nitrato de hierro (III).

31. - El mejor eluyente fue la fase móvil empleada para la separación cromatográfica, MeOH:30 mM HCOOH/NaCOOH, pH 4.2 (65:35).

32. - En las condiciones óptimas de acondicionamiento de la oxina-CPG se han obtenido recuperaciones de hasta el 64% para el 2-nitrofenol, 35% para el 4,6-dinitro-2-metilfenol y del 100% para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol cuando se eluyen con 2.0 mL de la fase móvil utilizada en cromatografía.

33. - La elución en un solo paso con la fase móvil utilizada en cromatografía facilitaría la posibilidad de la preconcentración en línea.

34. - El volumen de ruptura del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en la columna rellena de oxina-CPG es de 50.0 mL. Considerándose que el volumen de elución es de 2.0 mL, el factor de preconcentración para el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol es de veinticinco veces.

35. - La máxima capacidad de retención del 2,4-dinitro-6-secbutilfenol es de 0.4 mg por gramo de oxina-CPG.

Determinación de clorofenoles por cromatografía de gases / espectrometría de masas

36. - La determinación del pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,4-diclorofenol por cromatografía de gases / espectrometría de masas permite la cuantificación de estos compuestos previa preconcentración en columna oxina-CPG y posterior elución con diclorometano.

37. - El patrón interno seleccionado, 2,4,6-tribromofenol, presenta características físico-químicas similares a los clorofenoles estudiados, y en el cromatograma se distinguen cuatro picos cromatográficos bien diferenciados, correspondientes al 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4,6-tribromofenol y pentaclorofenol.

38. - La asignación de cada pico se realizó por comparación del espectro de masas correspondiente al máximo de cada pico cromatográfico con los espectros de las bases de datos Wiley. La selección de masas se realizó a partir del espectro de masas de cada clorofenol, escogiendo la relación masa/carga con la mayor abundancia. Las relaciones masa/carga, en u.m.a., elegidas para los clorofenoles y para el patrón interno fueron 264 para el pentaclorofenol, 196 para el 2,4,6-triclorofenol, 162 para el 2,4-diclorofenol, y 330 para el 2,4,6-tribromofenol.

39. - Las condiciones óptimas establecidas para la separación cromatográfica fueron temperatura del inyector 300°C, y gradiente de temperatura de 40 a 70°C durante un minuto y seguidamente a 20°C/min hasta 230°C durante 5 minutos.

40. - Los calibrados fueron lineales en intervalos de concentración de 7.0 a 15.0 mg/L para el pentaclorofenol, de 1.0 a 5.0 mg/L para el 2,4,6-triclorofenol, y de 5.0 a 12.0 mg/L para el 2,4-diclorofenol.

41. - Los límites de detección fueron de 2.0 mg/L para el pentaclorofenol, 0.5 mg/L para el 2,4,6-triclorofenol y 1.0 mg/L para el 2,4-diclorofenol, y los de cuantificación fueron 6.0 mg/L, 1.0 mg/L y 3.0 mg/L respectivamente.

**Preconcentración selectiva de clorofenoles sobre columna de oxina
inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG) y determinación por
cromatografía de gases / espectrometría de masas**

42. - Los clorofenoles se retienen en medio ácido y se eluyen con diclorometano para su posterior análisis por GC-MS. Cuando se preconcentran conjuntamente, las recuperaciones máximas fueron del 30.0 % para el 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol y del 88.8 % para el pentaclorofenol. En el caso del 2,4,6-triclorofenol, la recuperación aumenta hasta el 46.0 % cuando no se hallan presentes los otros dos clorofenoles.

43. - El volumen de ruptura es de 25.0 mL, lo que permite un factor de preconcentración de 2.5, ya que el volumen necesario para la elución es de 10.0 mL.

44. - La reproducibilidad del proceso global presenta desviaciones estándar relativas entre el 11.0 y el 25.0 %.

45. - El bajo volumen de ruptura y el alto límite de detección no permiten la determinación de estos clorofenoles en concentraciones traza.

Determinación de cloro- y nitrofenoles en diversas muestras

46. - Se ha determinado pentaclorofenol en madera de pino (serrín) en cantidades comprendidas entre 1 y 3 μg de pentaclorofenol por gramo de serrín. Los estudios de recuperación demuestran que es posible determinar el pentaclorofenol con alto grado de recuperación, 91.0%, y con una reproducibilidad, expresada como desviación estándar relativa, del 6.0%.

47. - Se ha determinado 2,4-dinitro-6-secbutilfenol añadido a zumo de limón en cantidades comprendidas entre 0.20 y 0.049 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de recuperación fueron del orden del 94.0 %, con una desviación estándar relativa del 8.6%, y demuestran que es posible determinar el 2,4-dinitro-6-secbutilfenol en las concentraciones máximas establecidas por la ley.

48. - En todos los casos, el tratamiento de muestra necesario ha sido mínimo, y esto ha permitido una alta reproducibilidad en el proceso global. La alta recuperación en muestras de naturaleza tan variada y a bajos niveles de concentración pone de manifiesto la aplicabilidad de las metodologías propuestas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. McMURRY, J. Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamérica, México (1994).
2. REALINI, P.A. J.Chromatogr. Sci. 19 (3), 124-129 (1981).
3. MORRISON, R. T.; BOYD, R.N. Química Orgánica. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. México (1990).
4. MONTGOMERY, J. M. Water Treatment Principles and Design. Wiley, New York, 385-386 (1985).
5. BALDWIN, D. A.; DEBOWSKI, J.K. Chromatographia, 26, 186 - 190 (1988).
6. LANGE'S. Handbook of Chemistry. 11 TH. Ed. Dean, J.A. McGraw-Hill Book Company, New York (1973).
7. Handbook of Chemistry and Physics. CRC-Press. 58 th edition, Cleveland, Ohio (1977-1978).
8. AMARAL, L. F .P.; ALVARENGA, M.A. Fundamentos de Química Orgánica. Edgard Blücher, Ed. Universidade de São Paulo (1980).
9. MARTÍNEZ, D.; POCURRUL, E.; MARCÉ, R.M.; BORRUL, F.; CALULL, M. J. Chromatogr. A, 734, 367-373 (1996).
10. Drinking Water Directive 76/464/EEC. Comission of the European Communities (1976).
11. EPA Method 604, Phenols, Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 58-66.
12. EPA method 625, Base/Neutrals and Acids, Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 153-174.
13. BORZELLECA, J.F.; CONDIE, L. W.; HAYES, J. R. Technical Report EPA-6001 D-84-234 (1984).
14. RIPQPT (Registro Internacional de Productos Químicos Potencialmente Tóxicos). Boletín RIPQPT, 7 (2), 32-34 (1985).

15. HAMILTON, S.J.; CLEVELAND, L.; SMITH, L. M.; LEBO, J. A.; MAYER, F. L. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5 (6), 543-552 (1986).
16. RAPPE, C. *The Handbook of Environmental Chemistry*. O. Hutzinger, Springer-Verlag, Berlin. Vol 3, Parte A, 157-174 (1980).
17. BANERJEE, S.; HOWARD, P. H.; ROSENBERG, A. M.; DOMBROWSKI, A. E.; SIKKA, H.; TULLIS, D. L. *Environ. Sci. Technol.*, 18 (6), 416-422 (1984).
18. BANERJEE, S.; HOWARD, P. H.; TULLIS D. L. *Environ. Sci. Technol.*, 19 (4), 374-375 (1985).
19. SCHULTZ, T. W.; RIGGIN, G. W. *Toxicol. Lett.*, 25 (1), 47-54 (1985).
20. SCHLEYER, R.; FILLIBECK, J.; HAMMER, J.; RAFFINS, B. *Wom. Wasser*, 85, 377 – 399 (1995).
21. MANTOVANI, A.; STAZI, A. V.; RICCIARDI, C.; MACRI, C.; ZAPPONI, G. *IAHS. Publ.*, 233, 187 – 193 (1995).
22. *Drinking Water Directive 80/778/EEC*. Comission of the European Communities, Brussels (1980).
23. BREWSTER, R. Q. *Química Orgánica*, Editorial Médico-Quirúrgica, 2ª Edición (1954).
24. PRIMO YUFERA, E.; CARRASCÓN DORRIEN, J. M. *Química Agrícola II*, Editorial Alhambra (1980).
25. MOHLER, E. F.; JACOB, L. N. *Anal. Chem.*, 29, 1369-1374 (1957).
26. AFGHAN, B .K.; BELLIVEAU, P. E.; LAROSE, R. H.; RYAN, J.F. *Anal. Chim. Acta*, 71, 355-366 (1974).
27. FOUTAINE, J. E.; JOSHIPURA, P. B.; KELIHER, P. N.; JOHNSON, J. D. *Anal. Chem.*, 46, 62-66 (1974).
28. FOUNTAINE, J. E.; JOSHIPURA, P.B.; KELIHER, P.N.; JOHNSON, J. D. *Anal. Chem.*, 47, 157 - 159 (1975).

29. SECCHIERE, M.; BENASSI, C.A.; PASTORE, S.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A.; LEVORATO, M.; GUERRATO, A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 674-678 (1991).
30. BOSCH, F.; FONT, G.; MAÑES, J. *Analyst*, 112 (9), 1335 - 1337 (1987).
31. NORWITZ, G.; BARDSLEY, A. H.; KELIHER, P. N. *Anal. Chim. Acta*, 128, 251-256 (1981).
32. NORWITZ, G.; KELIHER, P. N. *Anal. Chim. Acta*, 144, 273 - 276 (1982).
33. KOCH, S.; ACKERMANN, G.; BRUNNE, I. *Talanta*, 35 (9), 701 - 705 (1988).
34. LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; SANTOS DELGADO, M. J.; POLO DÍEZ, L. M. *Anal. Chim. Acta*, 258, 269-273 (1992).
35. NORWITZ, G.; NATARO, N.; KELIHER, P. N. *Anal. Chem.*, 58, 639 - 641 (1986).
36. ROMERO, J. S. E.; RODRÍGUEZ, L. A.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G.; RAMIS - RAMOS, G. *Analyst*, 119, 1381 - 1386 (1994).
37. VERMA, P. GUPTA, V.K. *J. Indian Chem. Soc.*, 60, 591 - 593 (1983).
38. BAVEJA, A.K.; GUPTA, V.K. *J. Indian Chem. Soc.*, 61, 348 - 350 (1984).
39. NAVARRO VILLOSLADA, F.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; SANTOS DELGADO, M. J.; POLO DÍEZ, L. M. *Organohalogen Compd.*, 2, 199 - 202 (1990).
40. NAVARRO VILLOSLADA, F.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; SANTOS DELGADO, M.J.; POLO DÍEZ, L. M. *Microchem. J.*, 44, 339 - 346 (1991).
41. NAVARRO VILLOSLADA, F.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; SANTOS DELGADO, M. J.; POLO DÍEZ, L. M. *Talanta*, 38 (11), 1341 - 1346 (1991).
42. CLADERA, A.; GÓMEZ, E.; ESTELA, J. M.; CERDÁ, V. *Anal. Chim. Acta*, 267, 95 - 102 (1992).

43. LIU, YI-MING., YU, RU-QIN. *Talanta*, 35 (9), 707-711 (1988).
44. PÉREZ ARRIBAS, L. V.; NAVARRO VILLOSLADA, F.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; POLO DÍEZ, L.M. *J. Chemometrics*, 7, 267-275 (1993).
45. NAVARRO VILLOSLADA, F.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; POLO DÍEZ, L. M. *Anal. Chim. Acta*, 313, 93-101 (1995).
46. NAVARRO VILLOSLADA, F.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; POLO DÍEZ, L. M. *Anal. Chim. Acta*, 308, 238-245 (1995).
47. VELASCO, A.; RUI, X.; SILVA, M.; PEREZ BENDITO, D. *Talanta*, 40, 1505-1510 (1993).
48. VERDU ANDRES, J.; BOSCH REIG, F.; CAMPINS FALCO, P. *Analyst*, 120, 299-304 (1995).
49. MONTERO ESCOLAR, M. R.; MORENO ROMAN, C.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; POLO DÍEZ, L. M. *Anal. Proc.*, 29, 358 (1992).
50. MORENO ROMAN, C.; MONTERO ESCOLAR, M. R.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; POLO DÍEZ, L. M. *Anal. Chim. Acta*, 288, 259-264 (1994).
51. MARKO-VARGA, G.; BARCELÓ, D. *Chromatographia*, 34 (3-4), 146-154 (1992).
52. DI CORCIA, A.; MARCHESE, S.; SAMPERI, R. *J. Chromatogr.*, 642, 175-184 (1993).
53. POCURULL, E; CALULL, M.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. *J. Chromatogr. A*, 719, 105-112 (1996).
54. FIEHN, O.; JEKEL, M. *J. Chromatogr. A*, 769, 189 - 200 (1997).
55. PUIG, D.; BARCELÓ, D. *J. Chromatogr. A*, 733, 371-381 (1996).
56. LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; SILVA VARGAS, M. E.; FERNÁNDEZ SALINERO, G.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; POLO DÍEZ, L. M. *Chimia* 52, EUROANALYSIS 10, M 22 (1998).

-
57. GODEJOHANN, M.; PREIB, A.; LEVSEN, K.; WÜNSCH, G. *Chromatographia*, 43 (11 - 12), 612 - 618 (1996).
 58. BREGA, A.; PRANDINI, P.; AMAGLIO, C.; PAFUMI, E. *J. Chromatogr.*, 535, 311-316 (1990).
 59. POCURRUL, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. *Chromatographia*, 41 (9-10), 521-526 (1995).
 60. GALCERAN, M. T.; JÁUREGUI, O. *Anal. Chim. Acta*, 304, 75-84 (1995).
 61. CARDELLICCHIO, N.; CAVALLI, S.; PIANGERELLI, V.; GIANDOMENICO, S.; RAGONE, P. *Frenesius J. Anal. Chem.*, 358, 749 - 754 (1997).
 62. DI CORCIA, A.; BELLIONI, A.; MADBOULY, M. D.; MARCHESE, S. *J. Chromatogr. A*, 733, 383-393 (1996).
 63. POCURULL, E.; CALULL, M.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. *Chromatographia*, 38 (9-10), 579-584 (1994).
 64. PRAUS, P.; *Anal. Chim. Acta*, 302, 39 - 44 (1995)
 65. FREBORTOVÁ, J.; TATARKOVICOVÁ, V. *Analyst*, 119, 1519-1523 (1994).
 66. ALARCÓN, P.; BUSTOS, A.; CAÑAS, B.; ANDRÉS, M. D.; POLO, L. M. *Chromatographia*, 24, 613-616 (1987).
 67. ANGELINO, S.; GENNARO, M. C. *Anal. Chim. Acta*, 346, 61 - 71 (1997).
 68. BARCELÓ, D.; DURAN, D.; VREEKEN, R. J.; JONG, G. J.; BRINKMAN, U. A. Th. *Anal. Chem.*, 62, 1696-1700 (1990).
 69. MARIS, F.A.; STAB, J. A.; JONG, G. J.; BRINKMAN, U. A. Th. *J. Chromatogr.*, 445, 129-138 (1988).
 70. POCURULL, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. *Chromatographia*, 40 (1-2), 85 - 90 (1995).
 71. ELVIRA COZAR, C.; CANO-FAUNA, P.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E. ; POLO DÍEZ, L.M. *Chromatographia*, 40, (1-2), 91-95 (1995).

-
72. MARTINEZ, D.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; CALULL, M. *Chromatographia*, 43 (11 - 12), 619 - 624 (1996).
 73. PUIG, D.; BARCELÓ, D. *Chromatographia*, 40 (7-8), 435-444 (1995).
 74. CASTILLO, M.; PUIG, D.; BARCELÓ, D. *J. Chromatogr. A*, 778, 301 - 311 (1997).
 75. CAPPILLO, A.; FAMIGLINI, G.; BERLONI, A. *J. Chromatogr. A*, 768, 215 - 222 (1997).
 76. AKKARA, J. A.; GREENBERGER, M.; KAPLAN, D. L. *J. Chromatogr.*, 604, 247 - 253 (1992).
 77. RAMIREZ MARTINEZ, J. R. *J. Sci. Food Agric.*, 43, 135-144 (1988).
 78. PUIG, D.; BARCELÓ, D. *Anal. Chim. Acta*, 311, 63-69 (1995).
 79. PUIG, D.; BARCELÓ, D. *J. Chromatogr. A*, 778, 313 - 319 (1997).
 80. BUSTO, O.; OLUCHA, J. C. ; BORRULL, F. *Chromatographia*, 32, (9 -10), 423-428 (1991).
 81. CHEE, K. K.; LAN, M. K.; LEE, H. K. *Anal. Chim. Acta*, 312, 271-280 (1995).
 82. MARKOWSKI, W.; DZIDO, T. H.; SOCZEWINSKI, E. *J. Chromatogr.*, 523, 81-89 (1990).
 83. MÖDER, M.; SCHRADER, S.; FRANCK, U.; POPP, P. *Frenesius J. Anal. Chem.*, 357, 326 - 332 (1997).
 84. BALLESTEROS, E.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M. *Anal. Chem.*, 62, 1587-1591 (1990).
 85. FELTES, J.; LEVSEN, K.; VOLMER, D.; SPIEKERMANN, M. *J. Chromatogr.*, 518, 21-40 (1990).
 86. SCHMIDT, L.; SUN, J. J.; FRITZ, J. S.; HAGEN, D. F.; MARKELL, C. G.; WISTED, E. E. *J. Chromatogr.*, 641, 57-61 (1993).
 87. VREULS, J. J.; JONG, G. J.; GHIJSEN, R. T.; BRINKMAN, U. A. Th. *J. Microcolumn Separations*, 5(4), 317-324 (1993).

88. BUCHHOLZ, K. D.; PAWLISZYN, J. *Anal. Chem.*, 66, 160-167 (1994).
89. CLARK, T. J.; BUNCH, J. E. *J. Chromatogr. Sci.*, 34, 272-275 (1996).
90. LEE, M. R.; YEH, Y. C.; HSIANG, W. S.; HWANG, B. H. *J. Chromatogr. A*, 806, 317 - 324 (1998).
91. KONTSAS, H.; ROSENBERG, C.; PFÄFLI, P.; JÄPPINEN, P. *Analyst*, 120, 1745-1749 (1995).
92. RODRÍGUEZ, I.; BOLLAÍN, M. H.; GARCÍA, C. M.; CELA, R. *J. Chromatogr. A*, 733, 405-416 (1996).
93. SWAMI, K.; NARANG, R. S. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 77 (5), 1304-1308 (1994).
94. RODRÍGUEZ, I.; MEJUTO, M. C.; BOLLAÍN, M. H.; CELA, R. *J. Chromatogr. A*, 786, 285 - 292 (1997)
95. SHANG-ZHI, S.; DUFFIELD, A. M. *J. Chromatogr.*, 284, 157-165 (1984).
96. FINGLER, S.; TKALCEVIÉ, B.; FRÖBE, Z.; DREVENKAR, V. *Analyst*, 119, 1135-1140 (1994).
97. LEE, H. B.; WENG, L. D.; CHAU, A. S. Y. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67 (6), 1086 - 1091 (1984).
98. INGRAM, L. L. Jr.; MCGINNIS, G. D.; PARIKH, S. V. *Anal. Chem.*, 51 (7), 1077-1079 (1979).
99. EDGERTON, T. R.; MOSEMAN, R. F. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (1), 197 - 199 (1979).
100. BOSCH REIG, F.; CAMPÍNS FALCÓ, P.; VERDÚ ANDRÉS, J. *J. Liq. Chromatogr.*, 18, 2229 - 2241 (1995).
101. JAHR, D. *Chromatographia*, 47 (1 - 2), 49 - 56 (1998).
102. CRESPIÁN, M. A.; BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M.; VARCÁRCEL, M. *J. Chromatogr. A*, 757, 165 - 172 (1997).
103. BARTÁK, P.; CÁP, L. *J. Chromatogr. A*, 767, 171 - 175 (1997).

-
104. HEBERER, T.; STAN, H. J. *Anal. Chim. Acta*, 341, 21 - 34 (1997).
 105. BOOTH, R. A.; LESTER, J. N. *J. Chromatogr. Sci.*, 32, 259 - 264 (1994).
 106. PATTON, G. W.; McCONNELL, L. L.; ZARANSKI, M. T.; BIDLAMAN, T. F., *Anal. Chem.*, 64, 2858-2861 (1992).
 107. TURNES, M. I.; RODRIGUEZ, I.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. *J. Chromatogr. A*, 683, 21-29 (1994).
 108. RENNER, G., *Toxicol. Environ. Chem.*, 27, 217 - 224 (1990).
 109. CABALLERO, M.; CELA, R.; PEREZ BUSTAMANTE, J. A. *Anal. Lett.*, 21, 63 -79 (1988).
 110. BALIKOVA, M.; NOVAKOVA, E.; KOHLICEK, J. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 75, 431 - 437 (1988).
 111. WILLIAMS, D. T.; TRAN, Q.; FELLIN, P.; BRICE, K. A., *J. Chromatogr.*, 549, 297 - 311 (1991).
 112. DEROUX, J. M.; GONZÁLEZ, C.; LE CLOIREC, P.; KOVACSIK, G. *Talanta*, 43, 365 – 380 (1996).
 113. BERTRAND, M. J.; STEFANIDIS, S.; DONAIS, A.; SARRASIN, B., *J. Chromatogr.*, 354, 331-340 (1986).
 114. EISERT, R.; LEVSEN, K. *J. Chromatogr. A*, 733, 143-157 (1996).
 115. MOL, H. G. J.; JANSSEN, H. G. M.; CRAMERS, C. A.; VREULS, J. J.; BRINKMAN, U. A. Th. *J. Chromatogr. A*, 703, 277-307 (1995).
 116. BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. *Anal. Chim. Acta*, 318, 1-41 (1995).
 117. ONG, C. P.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. *J. Chromatogr. Sci.*, 30,319-323 (1992).
 118. ONG, C. P., LEE, H. K.; LI, S. F. Y. *Anal. Chem.*, 62, 1389 - 1391 (1990).
 119. DRESSMAN, S. F.; SIMEONE, A. M.; MICHAEL, A. C. *Anal. Chem.*, 68, 3121 - 3127 (1996).
 120. REIGHARD, T. S.; OLESIK, S. V. *J. Chromatogr. A*, 737, 233-242 (1996).

121. ASHRAF-KHOROSSANI, M.; GIDANIAN, S.; YAMINI, Y. J. Chromatogr. Sci.; 33, 658 - 662 (1995).
122. VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. J. Anal. Off Anal. Chem. Int.; 77 (3), 785-789 (1994).
123. POCURULL, E.; SANCHEZ, G.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M. J. Chromatogr. A, 696, 31-39 (1995).
124. POCURULL, E.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. J. Chromatogr. A, 738, 1-9 (1996).
125. SLOBODNIK, J.; BROUWER, E. R.; GEERDIN, R. B.; MULDER, W. H.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. Th. Anal. Chim. Acta, 268, 55-65 (1992).
126. SLOBODNIK, J.; GROENEWEGEN, M. G. M.; BROUWER, E. R.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. Th. J. Chromatogr., 642, 359-370 (1993).
127. LAMPRECHT, G.; HUBER, J. F. K. J. Chromatogr. A, 667, 47-57 (1994).
128. NIELEN, M. W. F.; DE JONG, J.; FREI, R. W.; BRINKMAN, U. A. Th. Int. J. Environ. Anal. Chem., 25, 37-48 (1986).
129. KWADE, C.; VOIGTLÄNDER, R.; CAMMANN, K. Fresenius J. Anal. Chem., 342, 426-428 (1992).
130. GONZALO, E. R.; PAVÓN, J. L. P.; RUZICKA, J.; CHRISTIAN, G. D.; OLSON, D. C. Anal. Chim. Acta, 259, 37-44 (1992).
131. BROUWER, E. R.; BRINKMAN, U.A. Th. J. Chromatogr. A, 678, 223-231 (1994).
132. BROUWER, E. R.; LISKA, I.; GEERDINK, R. B.; FRINTROP, P. C. M.; MULDER, W. H.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. Th. Chromatographia, 32 (9-10), 445 - 452 (1991).
133. DENNISON, M. J.; HALL, J. M.; TURNER, A. P. F. Anal. Chem., 67, 3922-3927 (1995).

-
134. WANG, J.; FANG, L.; LOPEZ, D. *Analyst*, 119, 455 - 458 (1994).
 135. WANG, J.; LI, R. *Anal. Chem.*; 61, 2809 – 2811 (1989)
 136. GUIJARRO, E. C.; YAÑEZ SEDEÑO, P.; PINGARRÓN CARRAZÓN, J. M.; POLO DIÉZ, L. M. *Analyst*, 108, 573 – 580 (1983).
 137. TERABE, S.; OTSUKA, K.; ICHIKAWA, K.; TSUCHIYA, A.; ANDO, T. *Anal. Chem.*, 56, 111 - 113 (1984).
 138. OTSUKA, K.; TERABE, S.; ANDO, T. *J. Chromatogr.*, 348, 39-47 (1985).
 139. C. E. LIN.; W. C. LIN. *J. Chromatogr. A*, 732, 361-367 (1996).
 140. TURNES, M. I.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. *J. Chromatogr. A*, 733, 395-404 (1996).
 141. LI, G.; LOCKE, D. C. *J. Chromatogr. A*, 734, 357-365 (1996).
 142. VAN EMON, J. M.; GERLACH, R. W.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 48, 635 - 642 (1992).
 143. ALIMPIEV, S. S.; MLYNSKI, V. V.; BELOV, M. E.; NIKIFOROV, S. M. *Anal. Chem.*, 67, 181-186 (1995).
 144. CAMEL, V.; CAUDE, M. *J. Chromatogr. A*, 710, 3-19 (1995).
 145. POOLE, S. K.; DEAN, T. A.; OUDSEMA, J. M.; POOLE, C. F. *Anal. Chim. Acta*, 236, 3-12 (1990).
 146. WERKHOUVEN-GOEWIE, C. E.; BOON, W. N.; PRAAT, A. J. J.; FREI, R. W.; BRINKMANN, U. A. Th.; LITTLE, C. J. *Chromatographia*, 16, 53-59 (1982).
 147. NIELSEN, P. G. *Chromatographia*, 18 (6), 323-325 (1984).
 148. U. S. EPA. *Test Methods for Evaluating Solid Waste*, 3ª Edición, Washington D. C. (1987).
 149. BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. *Chromatographia*, 40 (7-8), 747-483 (1995).
 150. ZHENG-LIANG, Z.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. *Analyst*, 121, 1-6 (1996).

-
151. DI CORCIA, A.; MARCHESE, S.; SAMPERI, R.; CECCHINI, G.; CIRILLI, L. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 77 (2), 446-453 (1994).
 152. BIZIUK, M.; NAMIESNIK, J.; CZERWINSKI, J.; GORLO, D.; MAKUCH, B.; JANICKI, W.; POLKOWSKA, Z.; WOLSKA, L. *J. Chromatogr. A*, 733, 171-183 (1996).
 153. MELCHER, R. G.; BAKKE, D. W.; HUCHES, G. H. *Anal. Chem.*, 64, 2258-2262 (1992).
 154. KONTSAS, H.; ROSENBERG, C.; JÄPPINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. *J. Chromatogr.*, 636, 255-261 (1993).
 155. ONUSKA, F.I. *J. High Res. Chromatogr.*, 12, 4 - 11 (1989).
 156. SILVA VARGAS, M. E.; LEÓN GONZÁLEZ, M. E.; PÉREZ ARRIBAS, L. V.; POLO DÍEZ, L. M. Working Party on Analytical Chemistry, EUROANALYSIS IX, Fr P 83 (1996).
 157. CLADERA, A.; GÓMEZ, E.; ESTELA, J. N.; CERDÁ, V. *Anal. Chim. Acta*, 267, 103-109 (1992).
 158. FARREL, E. S.; PACEY, G. E. *Anal. Chem.*, 68, 93 - 99 (1996).
 159. KORENMAN, Y. I.; YERMOLAEVA, T. N. *Analyst*, 120, 2387-2391 (1995).
 160. ORMAD, P.; CORTÉS, S.; SARASA, J.; MARTÍN, A.; PUIG, A.; OVELLEIRO, J. L. *J. Chromatogr. A*, 733, 159-169 (1996).
 161. CHEN, P. H.; VANAUSDALE, W. A.; KEERAN, W. S.; ROBERTS, D. F.; *Chemosphere*, 26, 1743 - 1749 (1993).
 162. BARTH, R. C.; FAIR, P. S. *J. Am. Water Works Assoc.*, 84, 94 - 98 (1992).
 163. LEE, H. B.; PEART, T. E.; HONG-YOU, R. L. *J. Chromatogr.*, 636, 263-270 (1993).
 164. THOMSON, C.A.; CHESNEY, D. J. *Anal. Chem.*, 64, 848-853 (1992).
 165. HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J. *Anal. Chem.*, 66, 4005-4012 (1994).

-
166. LIU, Y.; LOPEZ AVILA, V.; ALCARAZ, M.; JONES, T. L. *Anal. Chem.*, 66, 4483-4489 (1994).
167. MESSING, R. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 2370-2371 (1969)
168. MESSING, R. A. *Enzymologia*, 38, 370-372 (1970)
169. BENNET, H. P. J.; ELLIOT, D. F.; LOWRY, P. J.; McMartin, Y. *Biochem. J.* 125, 80 - (1971)
170. OGINO, S. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1268 - 1271 (1970)
171. SUNDARAM, P. V.; CROOK, E. M. *Can. J. Biochem.*, 49, 1388 (1972)
172. TSUNG-HUI, J.; JOANELL, V. *PCT Int. Appl. WO.*, 19, 587 (1996).
173. HICKS, G. P.; UPDIKE, S. J. *Anal. Chem.* 38, 726-730 (1966)
174. BROWN, H. D.; PATEL, A. B.; CHATTOPADHYAY, S. K. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2, 231-235 (1968)
175. BAUMAN, E. K.; GOODSON, L. H.; GUILBAULT, G. C.; KRAMER, D. N. *Anal. Chem.*, 37, 1378-1381 (1965)
176. GUILBAULT, G. C.; KRAMER, D. N. *Anal. Chem.*; 37, 1675-1680 (1965)
177. CHANG, T. M. S., *Sci. J.*, 3, 62-68 (1967)
178. CHANG, T. M. S., POZNANSKY, M. J. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2, 187 - 199 (1968)
179. MAHLER, S. EDWARDS, P. A.; CHISHOLM, M. G. *J. Agri. Food Chem.*, 36, 946 - 951 (1988).
180. LI, N. N. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop.*, 10, 215-221 (1971)
181. MITZ, M. A., SUMMARIA, L. J. *Nature*, 189, 576-577 (1961)
182. MARSHALL, M. A., MOTTOLA, H. A. *Anal. Chem.*, 55, 2089-2093 (1983).
183. WEAVER, M. R.; HARRIS, J. M. *Anal. Chem.*, 61, 1001-1010 (1989).

-
184. MARSHALL, M. A., MOTTOLA, H. A. *Anal. Chem.*, 57, 729-733 (1985).
 185. JEZOREK, J. R.; FREISER, H. *Anal. Chem.*, 51(3), 366-373 (1979).
 186. CHOW, P. Y. T., CANTWELL, F. F. *Anal. Chem.*, 60(15), 1569-1573 (1988)
 187. KUO, M. S., MOTTOLA, H. A. *Anal. Chim. Acta*, 120, 255-266 (1980)
 188. DJANE, N. K., MALEUS, F., MARTINS, E., SAWULA, G., JOHANSSON, G. *Anal. Chim. Acta*, 316, 305 - 311 (1995)
 189. ABOLLINO, MENTASTI, E., PORTA, V., SARZANINI, C. *Anal. Chem.*, 62, 21-26 (1990)
 190. ZACHARIOU, M. HEARN, T. W. *J. Chromatogr.*, 599, 171-177 (1992)
 191. GÜBITZ, G., ZOONEN, P. V., GOOIJER, C., VELTHORST, N. H., FREI, R. W. *Anal. Chem.*, 57, 2071-2074 (1985)
 192. SAARI, L. A., SEITZ, W. R. *Anal. Chem.*, 54, 821-823 (1982)
 193. ALLEN, E. A., BOARDMAN, M. C., PLUNKETT, B. A. *Anal. Chim. Acta*, 196, 323-327 (1987)
 194. BARKER, S. A., DOSS, S. H., GRAY, C. J., KENNEDY, J. F., STACEY, M., YEO, T. H. *Carbohydr. Res.*, 20, 1-7 (1971).
 195. KAY, G., LILLY, M. D. *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 276-285 (1970).
 196. AXEN, R., ERNBACK, S. *Eur. J. Biochem.*, 18, 351- (1971)
 197. BARKER, S. A., EMERY, A. N., NOVAIS, J. M. *Process Biochem.*, 5, 11-13 (1972)
 198. GOLDSTEIN, L., LEVIN, Y., KATCHALSKI, E. *Biochemistry*, 3, 1913-1919 (1964)
 199. TODORAVA, O., IVANOVA, E., TEREVENINA, A., JORDANOV, N., DIMITROVA, K., BORISOV, G. *Talanta*, 36(8), 817-820 (1989)
 200. AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T. *Immunochemistry*, 6, 53 - 66 (1969)

-
201. AVRAMEAS, S., GUILBERT, B. *Biochimie*, 53, 603 – 614 (1972)
202. BASS, L., McILROY, D. K. *Biophys. J.* 8, 99 (1968)
203. MARFEY, P. S., KING, M. V. *Biochim. Biophys. Acta*, 105, 178-183 (1965)
204. ALLINGER, N. L., CAVA, M. P., DE JONGH, D. C., JOHNSON, C. R., LEBEL, N. A., STEVENS, C. L. *Química Orgânica*. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro (1978)
205. MEIJERS, A. P., VAN DER LEER, R. C. *Water Research*, 10, 597 – 604 (1976)
206. EBDON, L., BRAVEN, J. *Analyst*, 115, (1990)
207. TALSKEY, G. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 14(2), 81-91 (1983)
208. LEE, H. B., HONG-YOU, R. L., CHAU, A. S. Y. *J. Assol. Off Anal. Chem.*, 68(3), 422-426 (1985)
209. PERSAUD, G., CANTWELL, F. F. *Anal. Chem.*, 64, 89-94 (1992)
210. KAWAKUKO, S., TSUCHIYA, Y., IWATSUKI, M. *Anal. Chim. Acta*, 310, 501-507 (1995)
211. BEAUCHEMIN, D., BERMAN, S. S. *Anal. Chem.*, 61, 1857-1862 (1989)
212. DÍEZ, S., ZHOU, P., DAUNERT, S., VALIENTE, M. *Anal. Chim. Acta*, 315, 339-345 (1995)
213. VAN DER VLIS, E.; IRTH, H.; TJADEN, V. R.; VAN DER GREEF, J. *Anal. Chim. Acta*, 271, 69 – 75 (1993).
214. B. O. E. nº 62, 13 de marzo de 1984
215. B. O. E. nº 58, 2004 (1994). Trasposición de las Directivas de la Comunidad Europea, números 90/642/CEE; 93/57/CEE; 93/58/CEE y 79/700/CEE.

