

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y APLICACIONES DE TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS AL ANÁLISIS AMBIENTAL Y DE ALIMENTOS

ERICA ELVIRA VILLAROEL SOLIS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y APLICACIONES DE TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS AL ANÁLISIS AMBIENTAL Y DE ALIMENTOS

ERICA ELVIRA VILLAROEL SOLIS

Trabajo de Grado presentado al Comité Curricular y de Investigaciones
del Departamento de Química como requisito parcial para optar el título de
Químico

Directores

SONIA XIMENA DELGADO M.Sc.
MILTON ROSERO MOREANO M.Sc.
GONZALO TABORDA OCAMPO Ph. D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2010

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y APLICACIONES DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS AL ANÁLISIS AMBIENTAL Y DE ALIMENTOS

Esta pasantía de investigación se llevó a cabo en el marco del proyecto denominado “ESTUDIO DE LA REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y PATÓGENOS DE AGUA NATURAL PARA CONSUMO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA CWPO” aprobado y financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales – VIPRI de la Universidad de Nariño, en convenio con dos entidades más, Empresa de Obras Sanitarias de Pasto EMPOPASTO S.A. E.S.P. y la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Caldas mediante el convenio 01 de 2008. Fue desarrollada por el GRUPO DE INVESTIGACION DE CROMATOGRARFÍA Y TÉCNICAS AFINES bajo la dirección del Doctor Gonzalo Taborda Ocampo, Magister Milton Rosero Moreano y la codirección de M.Sc. Ximena Delgado

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1 del acuerdo No. 324 del 11 de Octubre de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Abril de 2010

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza para comenzar cada día y por darme cada una de las cosas más valiosas que tengo en la vida.

A mi madre por ser el motor de mi vida y el pilar principal en la construcción de mi futuro desde el momento de mi nacimiento.

A mis hermanos por su apoyo incondicional a pesar de todas las pruebas que se presentan en el camino.

A mi padre, porque sé que en donde se encuentre se siente orgulloso de la hija que tiene.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de proyecto Doctor Gonzalo Taborda Ocampo, M.Sc. Milton Rosero Moreano y M.Sc. Ximena Delgado por toda su colaboración.

Al grupo de investigaciones en materiales funcionales y catálisis de la Universidad de Nariño por su acogida y por iniciarme en el camino de la investigación.

Al grupo de investigación en Cromatografía y Técnicas Afines de la Universidad de Caldas y a su director por su acogida y acompañamiento en el desarrollo de mi trabajo de grado.

A la empresa EMPOPASTO por su colaboración para el traslado hacia la ciudad de Manizales para la ejecución de la práctica.

A todos los profesores que hicieron parte de mi formación profesional

A mi familia en especial por todo el esfuerzo y dedicación que me fue dada de su parte para que pueda alcanzar este logro.

A mis compañeros con los que compartí momentos inolvidables de mi vida, gracias porque también fueron mis amigos.

TABLA DE CONTENIDO

	pag.
INTRODUCCIÓN	19
1. MARCO REFERENCIAL	21
1.1. ANTECEDENTES	21
1.1.1. Determinación de los compuestos objetivo de estudio	21
1.1.1.1. Determinación de fenol mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia	21
• Fenol y subproductos de oxidación	21
• Importancia del estudio del fenol	22
• Técnicas estandarizadas para la determinación de fenol	23
1.1.1.2. Determinación de fipronil mediante cromatografía	25
• Fipronil	25
• Determinación de fipronil por cromatografía de gases	26
• Determinación de fipronil mediante cromatografía de líquidos	29
1.2. MARCO TEÓRICO	31
1.2.1. Técnica de extracción	31
1.2.1.1. Microextracción en fase sólida	31
1.2.2. Técnicas cromatográficas	33
1.2.2.1. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	33
1.2.2.2. Detección con arreglo de diodos	33

1.2.2.3. Cromatografía de gases	34
1.2.2.4. Espectrometría de masas	35
1.2.2.5. Acoplamiento cromatografía de gases - espectrometría de masas	36
1.2.2.6. Detección con microcaptura de electrones	36
1.2.3. Técnica de cuantificación por estándar interno	37
2. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA EMPRESARIAL	39
2.1. FASE DE ENTRENAMIENTO	39
2.1.1. Entrenamiento en Microextracción en fase sólida (SPME)	39
2.1.2. Entrenamiento en cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	39
2.1.3. Entrenamiento en cromatografía de gases (GC)	40
2.2. VALIDACIÓN DE FENOL Y SUBPRODUCTOS DE OXIDACION MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA HPLC	41
2.2.1. Instrumentación	41
2.2.2. Cromatografía de líquidos con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	42
2.2.3. Métodos	42
2.2.4. Curvas de calibración	42
2.3. DETERMINACIÓN DE FIPRONIL EN LECHE DE VACA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SPME Y CROMATOGRFÍA DE GASES	43
2.3.1. Instrumentación	43
2.3.2. Cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones (GC- μ ECD)	44

2.3.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. (GC-MS)	44
2.3.4. Métodos	44
2.3.5. Microextracción en fase sólida (SPME)	45
2.3.6. Curva de calibración	45
2.3.7. Tratamiento de la muestra	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1. FENOL Y SUBPRODUCTOS PRIMARIOS DE OXIDACIÓN	46
3.1.1. Curvas de calibración	46
3.1.2. Validación de resultados	52
3.2. DETERMINACION DE FIPRONIL EN LECHE DE VACA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA SPME Y CROMATOGRFÍA DE GASES	55
4. CONCLUSIONES	59
5. LOGROS ALCANZADOS	60
6. RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

	pg.
Figura 1. Cromatogramas de la cuantificación de fipronil por el método de estándar interno	26
Figura 2. Cromatograma de cuantificación de fipronil mediante estándar Interno	28
Figura 3. Cromatograma de la determinación de fipronil mediante HPLC	30
Figura 4. Sistema de dispositivo para la microextracción en fase sólida	31
Figura 5. Tipos de microextracción en fase sólida	32
Figura 6. Sistema de ionización de espectrometría de masas	34
Figura 7. Acoplamiento de cromatografía de gases con espectrometría de masas	35
Figura 8. Sistema de detección de microcaptura de electrones	36
Figura 9. Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia	39
Figura 10. Cromatógrafo de gases con detectores μ ECD y un FID	40
Figura 11. Curva de calibración a 210nm de longitud de onda de detección	48
Figura 12. Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos a 210nm	49
Figura 13. Curva de calibración a 220nm de longitud de onda de detección	49
Figura 14. Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos a 220nm	50
Figura 15. Curvas de calibración de los cuatro compuestos a 240nm	51
Figura 16. Cromatograma de la mezcla de compuestos a 240nm	52
Figura 17. Curva de calibración por el método del estándar interno	56
Figura 18. Cromatograma de la muestra dopada con fipronil y adición de estándares	57
Figura 19. Espectro UV correspondiente al fenol	65
Figura 20. Espectro UV correspondiente al catecol	66
Figura 21. Espectro UV correspondiente a la hidroquinona	67
Figura 22. Espectro UV correspondiente a la benzoquinona	68
Figura 23. Barrido de las tres longitudes de onda	69
Figura 24. Perfil cromatográfico	70
Figura 25. Cromatograma de identificación de la oxitetraciclina	72
Figura 26. Espectro UV de la oxitetraciclina	72
Figura 27. Cromatograma de la determinación semicuantitativa de hecogeninas por estándar interno	74
Figura 28. Espectro UV característico para las hecogeninas aisladas del jugo de fique	74
Figura 29. Curva de calibración del difenilacetileno con hexadecano como estándar interno a la misma concentración	76
Figura 30. Cromatograma para cuantificación de la formación de Difenilacetileno	77
Figura 31. Gráfico de superficies de respuesta en la optimización de la	

reacción de Sonogashira

77

Figura 32. Cromatograma de identificación de metano en líquido
Ruminal

78

LISTA DE TABLAS

	pg.
Tabla 1. Característica del fipronil y algunos de sus derivados	28
Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el detector de μ ECD	42
Tabla 3. Condiciones cromatográficas para el detector de MS	43
Tabla 4. Determinación de los tiempos de retención del fenol y sus subproductos primarios de oxidación	45
Tabla 5. Factores de selectividad y de capacidad de los analitos de interés	46
Tabla 6. Características analíticas para el método	47
Tabla 7. Longitudes de onda de máxima absorbancia para los analitos de interés	47
Tabla 8. Ecuaciones resultantes para las curvas de calibración de los cuatro compuestos a 220nm como longitud de onda de detección	48
Tabla 9. Ecuaciones resultantes para los cuatro compuestos a 220nm como longitud de onda de detección	50
Tabla 10. Curva de calibración de los cuatro compuestos a 240nm	51
Tabla 11. Ecuaciones resultantes para los cuatro compuestos a 220nm como longitud de onda de detección	52
Tabla 12. Parámetros estadísticos para la determinación de fenol	53
Tabla 13. Parámetros estadísticos para la determinación de hidroquinona	53
Tabla 14. Parámetros estadísticos para la determinación de benzoquinona.	53
Tabla 15. Parámetros estadísticos para la determinación de catecol	54
Tabla 16. Determinación de los tiempos de retención del Fipronil y de los estándares	55
Tabla 17. Curva de calibración por el método de estándar interno	55
Tabla 18. Factores de respuesta para cada concentración de fipronil	56
Tabla 19. Cuantificación de fipronil en una muestra de leche dopada	58
Tabla 20. Condiciones cromatográficas para la determinación de hecogeninas en jugo de fique	71
Tabla 21. Condiciones cromatográficas para el seguimiento de la reacción de acoplamiento C–C tipo Sonogashira	75
Tabla 22. Datos curva de calibración del difenilacetileno mediante estándar interno	76
Tabla 23. Condiciones cromatográficas para la determinación de metano en líquido ruminal de vaca	78

LISTA DE ESQUEMAS

	pg.
Esquema 1. Principales productos de oxidación de fenol	22
Esquema 2. Formación de sustancias húmicas a partir de derivados del Fenol	23
Esquema 3. Productos de oxidación del piragol	25
Esquema 4. Estructura del fipronil	25
Esquema 5. Formación de residuos de fipronil	29
Esquema 6. Estructura de la oxitetraciclina	71
Esquema 7. Estructura de las hecogeninas	73
Esquema 8. Estructura del colesterol	73
Esquema 9. Reacción de acoplamiento entre clorobenceno y fenilacetileno	75

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

μ ECD: Detector de Microcaptura de Electrones
A: Área
 A_{Istd} : Área del estándar interno
 A_x : Área del analito
BDD electrodo: Electrodo de diamante dopado con boro
BQ: Benzoquinona
C: Concentración
CC: Catecol
 C_{Istd} : Concentración del estándar interno
CWAO: Oxidación catalítica con aire húmedo
CWPO: Oxidación Catalítica en Fase Húmeda
 C_x : Concentración del analito
DAD: Detector de Arreglo de Diodos
ECD: Detector de Captura de electrones
F: Factor de respuesta
FID: Detector de Ionización con Llama
GC: Cromatografía de Gases
GC- μ ECD: Cromatografía de Gases con Detector de Microcaptura de Electrones
GC- MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
HPLC-DAD: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con Detector de Arreglo de Diodos
HQ: Hidroquinona
HS-SPME: Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza
LC: Cromatografía Líquida
 M^+ : Ion molecular
min: minutos
MS: Espectrometría de Masas
nm: nanómetros
°C: Grados Centígrados
PAOs: Procesos Avanzados de Oxidación
PH: Fenol
pH: Potencial de hidrógeno
ppb: partes por billón
ppm: partes por millón
ppt: partes por trillón
RP-HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
SPDs: subproductos de desinfección
SPE: Extracción en Fase Sólida
SPME: Microextracción en Fase Sólida
TCD: Detector de Conductividad Térmica
uv: microvoltios
UV: Ultravioleta

RESUMEN

En la realización de esta práctica empresarial se llevó a cabo la validación de fenol y sus subproductos de oxidación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos (HPLC – DAD) a distintas longitudes de onda para la cuantificación de los cuatro analitos de interés en un tiempo de análisis de 7,5min. Con el fin de que los datos obtenidos en este trabajo puedan ser aplicados para el seguimiento de la reacción de oxidación de fenol mediante procesos avanzados de oxidación. De esto se obtuvo un límite de detección de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en un rango dinámico lineal de 10 a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Se estandarizó la determinación de fipronil en una muestra de leche dopada con este insecticida mediante la técnica microextracción en fase sólida (SPME) y las técnicas de separación, cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones (GC- μ ECD) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en un tiempo de análisis de 24min. Para esto se obtuvo una recuperación del 90,58% en un rango dinámico lineal de 100 a $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}$. Así se responde a una necesidad del sector lechero del Departamento de Armenia y autoridades sanitarias cuya preocupación por una posible intoxicación con este insecticida podrá ahora ser abordada científicamente y con los instrumentos más modernos puestos a su servicio, y con métodos analíticos validados.

Para este efecto se comenzó con un entrenamiento en el manejo adecuado de equipos de cromatografía tanto de gases como de líquidos con distintos tipos de detección, con esto se estandarizaron una serie de métodos con el fin de afianzar en el manejo de estas técnicas instrumentales.

ABSTRACT

In conducting this business practice was carried out validation of phenol and its oxidation products by liquid chromatography high-efficiency diode array detection (HPLC - DAD) at various wavelengths for the quantification of the four analytes interest in an analysis time of 7.5 min. In order that the data obtained in this study can be applied to monitor the oxidation reaction of phenol by advanced oxidation processes. From this we obtained a detection limit of $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in a linear dynamic range of 10 to $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

We standardized the determination of fipronil in a milk sample doped with this insecticide by solid phase microextraction technique (SPME) and separation techniques, gas chromatography with electron microcapture detection (GC- μ ECD) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) in an analysis time of 24min. For this we obtained a recovery of 90.58% over a linear dynamic range of $100\text{-}400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. This meets a need in the dairy sector of Armenia Department and health authorities whose concern for a possible insecticide can now be addressed scientifically and with more modern instruments placed at his service, and validated analytical methods.

To this effect began with training in the proper handling of equipment both gas chromatography and liquid with different types of detection, it was standardized with a range of methods to enhance the training.

INTRODUCCIÓN

Debido a que el agua es necesaria para la supervivencia de los organismos vivos en el planeta, es de gran importancia conocer los contaminantes presentes en esta, sobre todo tratándose del agua de consumo humano. Comités de expertos en saneamiento e higiene de la Organización Mundial de la Salud, han señalado en múltiples ocasiones, la relación entre grandes epidemias o endemias y la contaminación de los suministros de agua.

Dicha contaminación del agua de consumo ha sido un tema preocupante desde hace años, sin embargo los compuestos orgánicos apenas eran considerados y ceñían a un número muy escaso de sustancias o familias de compuestos.

Hoy en día se sabe que el agua se ve afectada sobremanera por la materia orgánica de origen natural. Esta materia orgánica natural, está compuesta principalmente por sustancias húmicas que son macromoléculas formadas por polifenoles con estructuras bastante complejas y diferentes unas de otras.

En la ciudad de Pasto como en otras ciudades, se utilizan agentes floculantes para la eliminación de dicha carga orgánica presente en el agua, pero es difícil asegurar una completa eliminación de esta, lo cual conlleva a la formación de subproductos halogenados de desinfección en el proceso de cloración llevado a cabo después del tratamiento fisicoquímico, ya que en las aguas naturales el cloro reacciona fácilmente con varias sustancias dando lugar a un consumo del cloro residual libre. Por otra parte los estudios han revelado que algunos de los peores causantes de sabor y olor son los compuestos producidos por reacción del cloro con sustancias fenólicas. La adición de pequeñas cantidades de cloro al agua que contenga esas sustancias produce compuestos clorofenólicos (SPDs), que dan los característicos y sumamente objetables sabores y olores fenólicos, estos representan un riesgo potencial para la salud de la población por su alta toxicidad la cual ha sido ampliamente estudiada.

El interés por el estudio de este tipo de problemas reales generó un convenio interinstitucional entre el Grupo de Investigaciones de Materiales Funcionales y Catálisis de la Universidad de Nariño y el Grupo de Investigaciones en Cromatografía y Técnicas Afines de la Universidad de Caldas con participación directa de la empresa responsable de la potabilización del agua que abastece a la ciudad de Pasto, EMPOPASTO S.A. E.S.P. con el fin de determinar las principales especies orgánicas de origen natural que no son eliminadas con el tratamiento fisicoquímico actual que se le proporciona al agua en dicha planta haciendo uso de herramientas cromatográficas con el fin de construir un modelo que permita realizar el seguimiento de la remoción de estas sustancias al aplicar la tecnología CWPO, como alternativa para la remoción de dichos contaminantes.

Para tales efectos el comité curricular del departamento de Química aprobó en el acuerdo 034 A del 19 de octubre de 2009 un proyecto de trabajo de grado en la modalidad de práctica empresarial bajo la dirección y supervisión de las instituciones involucradas en el convenio 01 de 2008 donde se contemplan como objetivos fundamentales la realización de una capacitación en técnicas cromatográficas para la validación de fenol utilizado como molécula modelo de precursores orgánicos de SPDs y sus subproductos de oxidación en aguas de consumo.

Esta práctica se dividió en dos fases, la primera involucró la determinación y cuantificación de fipronil en una muestra de leche dopada con este compuesto, dada a la experiencia en análisis de alimentos con la que cuenta el Grupo de investigación de Cromatografía y Técnicas Afines, debido a que se tienen indicios de que en esta matriz eventualmente puedan encontrarse residuos de este insecticida ya que en algunos lugares del país se emplea como garrapaticida sin el debido control. El fipronil al estar en contacto con las ubres de la vaca es probable que puedan encontrarse trazas de este, lo cual ocasionaría un problema grave tanto para la industria alimentaria como para la salud humana.

Por lo tanto es de vital importancia la aplicación de técnicas que permitan identificar dichos compuestos en las matrices a tratarse, para esto se cuenta con técnicas de extracción como la microextracción en fase sólida y de análisis como la cromatografía de gases, las cuales permiten llegar a la cuantificación de estas sustancias.

1. MARCO REFERENCIAL

Esta sección contiene revisión bibliográfica correspondiente a estandarizaciones de determinaciones de los compuestos que son el objeto de estudio de este trabajo mediante técnicas de extracción conocidas y análisis cromatográfico. Se darán a conocer las técnicas que se utilizaron para la realización de la práctica empresarial,

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Determinación de los compuestos objetivo de estudio

1.1.1.1. Determinación de fenol mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

- Fenol y subproductos de oxidación. El fenol al igual que algunos subproductos de oxidación, es una sustancia altamente tóxica aun en concentraciones traza por lo que su eliminación de los efluentes acuosos es indispensable antes de ser devueltos a los cuerpos naturales de agua¹.

El fenol es degradado rápidamente en el aire, generalmente en 1 ó 2 días pero puede permanecer en el agua durante una semana o más. El fenol que permanece en el suelo puede ser degradado por bacterias u otros microorganismos.

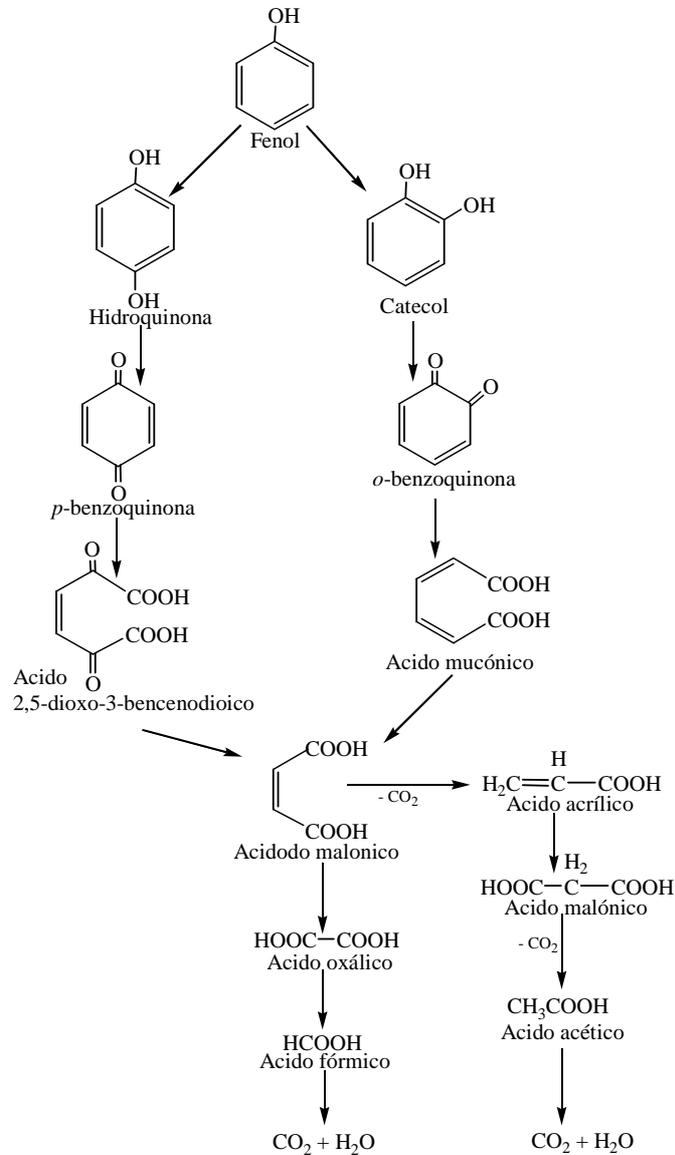
En el proceso de oxidación de fenol, se forma una gran variedad de compuestos intermediarios, debido a una oxidación parcial, entre ellos, los observados mayoritariamente son: catecol, hidroquinona, benzoquinona, ácidos maleico, oxálico, acético, etc. Al parecer, los intermedios de tipo bencenodiol o quinonas, una vez formados, se transforman rápidamente a compuestos de bajo peso molecular, siendo los ácidos los más refractarios a la oxidación total, a CO₂. En el esquema 1 se presenta un esquema de los principales compuestos formados en el proceso de oxidación.²

- Importancia del estudio del fenol. Hoy en día se sabe que el agua se ve afectada de sobremanera por la materia orgánica de origen natural, la cual representa uno de los problemas de salud pública más importantes, además, es la principal responsable del color orgánico del agua y es de difícil remoción.

¹ GALEANO, L., MORENO, S., MOLINA, R., MORALES, A., Separación y cuantificación por CLAR, de los principales productos en la oxidación catalítica del fenol. Centro de Catálisis Heterogénea. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, (2002), p. 1

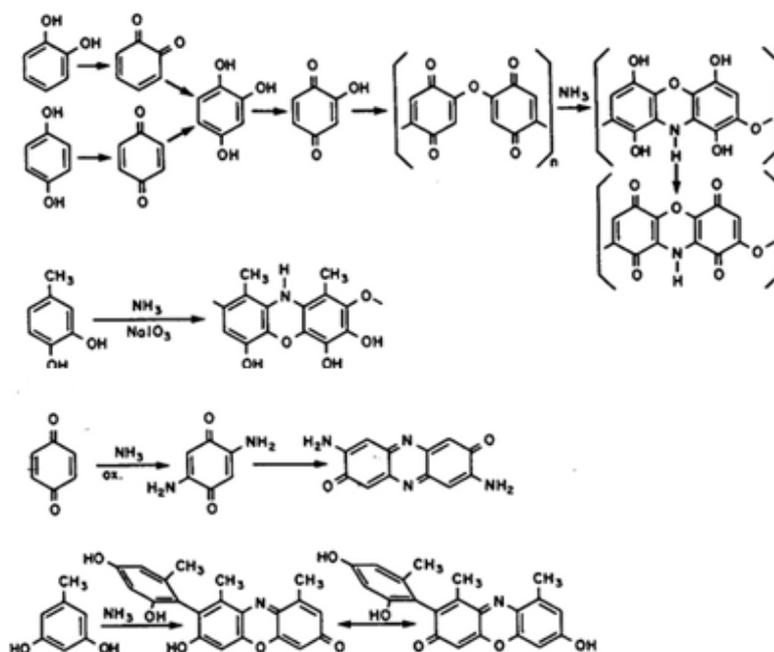
² GARCIA, F., SANTOS, A., Oxidación catalítica de compuestos fenólicos en aguas residuales. Dpto. de Ingeniería Química. Facultad de CC. Químicas. Universidad Complutense de Madrid. (1999), p. 269

Esquema 1. Principales productos de oxidación de fenol.



Esa materia orgánica natural, está compuesta principalmente por sustancias húmicas, estas son macromoléculas formadas por estructuras fenólicas que interaccionan una con otra de forma distinta para dar origen a sustancias estructuralmente bastante complejas y diferentes unas de otras. En el esquema 2 se muestra un ejemplo de las interacciones que originan sustancias húmicas.

Esquema 2. Formación de sustancias húmicas a partir de derivados del fenol.



Por otra parte los estudios han revelado que algunos de los peores causantes de sabor y olor son los compuestos producidos por reacción del cloro con sustancias fenólicas. La adición de pequeñas cantidades de cloro al agua que contenga esas sustancias produce compuestos clorofenólicos (SPDs), que dan los característicos y sumamente objetables sabores y olores fenólicos, estos representan un riesgo potencial para la salud de la población por su alta toxicidad la cual ha sido ampliamente estudiada.^{3,4}

- Técnicas estandarizadas para la determinación de fenol. Este método se ha desarrollado en varios trabajos de investigación con el fin de realizar el seguimiento de la descomposición de fenol (PH) y la formación de productos primarios por oxidación: catecol (CC), hidroquinona (HQ) y benzoquinona (BQ) para realizar estudios cinéticos de la actividad catalítica de nuevos materiales.

En la investigación de Hrvoje et al.(2010)⁵ se realizó la evaluación de la aplicación de procesos avanzados de oxidación (PAOs), procesos tipo Fenton y Fenton fotoasistido; Fe²⁺/H₂O₂, Fe³⁺/H₂O₂, Fe⁰/H₂O₂, UV/Fe²⁺/H₂O₂, UV/Fe³⁺/H₂O₂ y UV/Fe⁰/H₂O₂, para la degradación de fenol como modelo de contaminante

³ DUAN, J.; GREGORY, J.; *Advances in Colloid and Interface Science*, 100-102 (2002), p. 497, 499

⁴ PARK, S., YOON, T.; *Desalination*, 239 (2009) 146,157

⁵ MAJA., A., HRVOJE, K., NATALIJA, K., DANUTA, L., LONČARIĆ, A. Heterogeneous Fenton type processes for the degradation of organic dye pollutant in water — The application of zeolite assisted AOPs. *Desalination* (2010) en proceso.

orgánico en aguas residuales. El seguimiento de la reacción se hizo en un HPLC con una columna C18, y detección de arreglo UV, la fase móvil fue 2% ácido acético/20% acetonitrilo/78% agua con un flujo de 1 mL min^{-1} . La descomposición de fenol fue evaluada en $\lambda = 270\text{ nm}$, mientras que el seguimiento de formación y luego degradación de los productos primarios de oxidación fueron $\lambda = 276\text{ nm}$ para el catecol, $\lambda = 290\text{ nm}$ para la hidroquinona y $\lambda = 245\text{ nm}$ para la benzoquinona.

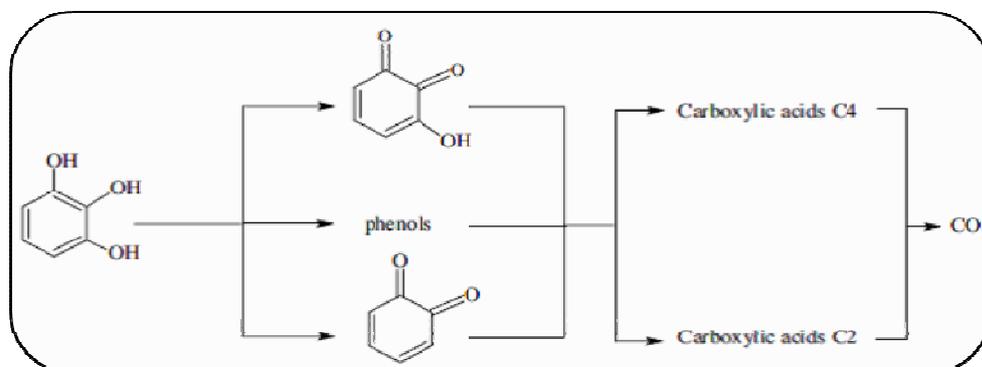
Eftaxias y colaboradores (2006)⁶ realizaron el estudio de la oxidación de fenol con aire húmedo (CWAO) sobre una superficie de carbón activado utilizado como catalizador, ellos en su trabajo la estandarización esta reacción mediante HPLC, usando una columna C18 fase reversa (Spherisob ODS-2). La separación se realizó con una fase móvil en gradiente con un flujo de 1 mL/min empezando en 100% agua y finalizando en la mezcla 40%/60% de metanol/agua. Los intermedios fueron detectados con absorbancia UV en una longitud de onda de 210 nm durante los primeros 20 minutos y a 254 nm para la detección del fenol. A diferencia del trabajo anterior, las curvas de calibración para este método fueron realizadas por separado para cada estándar.

Bensalah y su grupo (2009)⁷ hicieron un estudio sobre la aplicación de un tratamiento electroquímico de aguas residuales que contienen pirogalol (1,2,5-trihidroxibenceno) mediante oxidación anódica BDD, en este trabajo no se realiza la estandarización de la determinación de fenol, sin embargo se parte de uno de sus subproductos. Este método se llevó a cabo mediante HPLC usando una columna Nucleosil C18, la fase móvil usada fue 60% de agua y 40% metanol; a un flujo de $0,50\text{ mL min}^{-1}$ con un detector UV a una longitud de onda de 270 nm . Los ácidos carboxílicos fueron evaluados a una longitud de onda de 210 nm con fase móvil de ácido fosfórico al 0,15% con un flujo de $0,15\text{ mL min}^{-1}$. Cabe destacar que aunque esta estandarización no parte desde la molécula objeto de este estudio, no solo tiene en cuenta los productos primarios de oxidación, sino también los que involucran la apertura del anillo aromático como lo son los ácidos carboxílicos. En el esquema 3 se muestra un resumen de los productos objetivo de la investigación realizada

⁶ EFTAXIAS, A., FONT, J. FORTUNY, A., FABREGAT, A., STUBER, F. Catalytic wet air oxidation of phenol over active carbon catalyst Global kinetic modelling using simulated annealing. *Applied Catalysis B: Environmental* 67 (2006) 12–23

⁷ BENSALAH, N., TRABELSI, H., GADRI, A. Electrochemical treatment of aqueous wastes containing pyrogallol by BDD-anodic oxidation. *Journal of Environmental Management* 90 (2009) 523-530

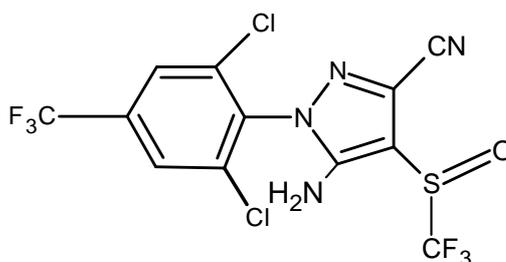
Esquema 3. Productos de oxidación del piragol.



1.1.1.2. Determinación de fipronil mediante cromatografía.

- Fipronil: El 5-amino-1-(2,6-dicloro-trifluoro-p-tolil)-3-ciano-4-trifluorometilsulfinilpirazol es un insecticida fenilpirazolo descubierto en 1985 por la compañía Rhore-Poulenc Agro.⁸ Este es extremadamente activo que actúa interrumpiendo el sistema nervioso central del insecto, bloqueando el paso de iones cloruro a través del receptor ácido gama amino butírico (GABA). Este compuesto es usado a nivel mundial para el control de diferentes plagas agro culturales tales como insectos lepidópteros, ortóptero y coleópteros y contra las garrapatas y termitas sobre animales domésticos. En el esquema 4 se muestra la estructura del fipronil.⁹

Esquema 4. Estructura del fipronil.



Sobre este insecticida se han realizado algunos estudios en muestras ambientales como sólidos y agua. El análisis de fipronil ha sido generalmente llevado a cabo por cromatografía con diferentes tipos de detectores selectivos tales como detector de captura de electrones (ECD) (Bobé et al., 1998¹⁰; Ramesh and

⁸ TOMLIN, C. The Pesticide Manual: A World Compendium, 10th ed, British Crop Protection Council, Croydon, 1994.

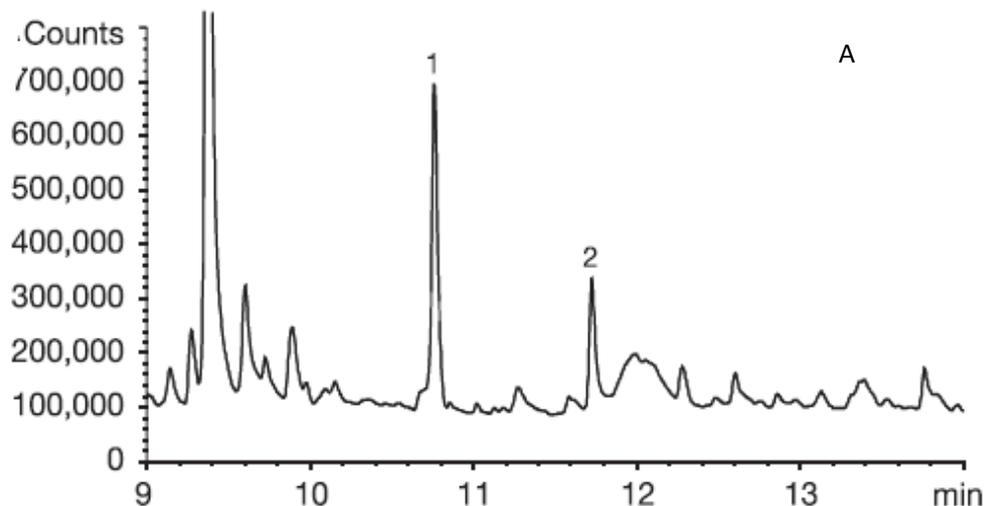
⁹ DECOURTYE, A., DEVILLERS, J., GENECQUE, E., LEMENACH, K., BUDZINSKI, H., CLUZEA, U., PHAMDELÉGUE, M. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee. *Apis mellifera*. Arch Environ Contam Toxicol 48 (2005) 242-250.

¹⁰ BOBÉ, A., COOPER, J., COSTE, C., MULLER, M. Behaviour of fipronil in soil under sahelian plain

Balasubramanian, 1999¹¹; Pei et al., 2004¹²) y espectrometría de masas (MS) (Morzycka, 2002¹³; Jiménez et al., 2007).¹⁴

- Determinación de fipronil por cromatografía de gases. Sanchez et al. (2005)¹⁵ Llevaron a cabo la determinación de residuos de fipronil en miel y polen mediante cromatografía de gases con detección ECD y MS, para la preparación de la muestra utilizaron extracción en fase sólida. La cuantificación de este insecticida se realizó mediante el método de estándar interno para lo cual se utilizó heptaclor, compuesto ampliamente utilizado para la determinación y cuantificación de organoclorados, en la figura 1 se muestra el cromatograma correspondiente a la cuantificación por estándar interno.

Figura 1. Cromatogramas de la cuantificación de fipronil por el método de estándar interno tomado de Sanchez et al. (2005).



field conditions. *Pestic Sci* 52 (1998) 275-281.

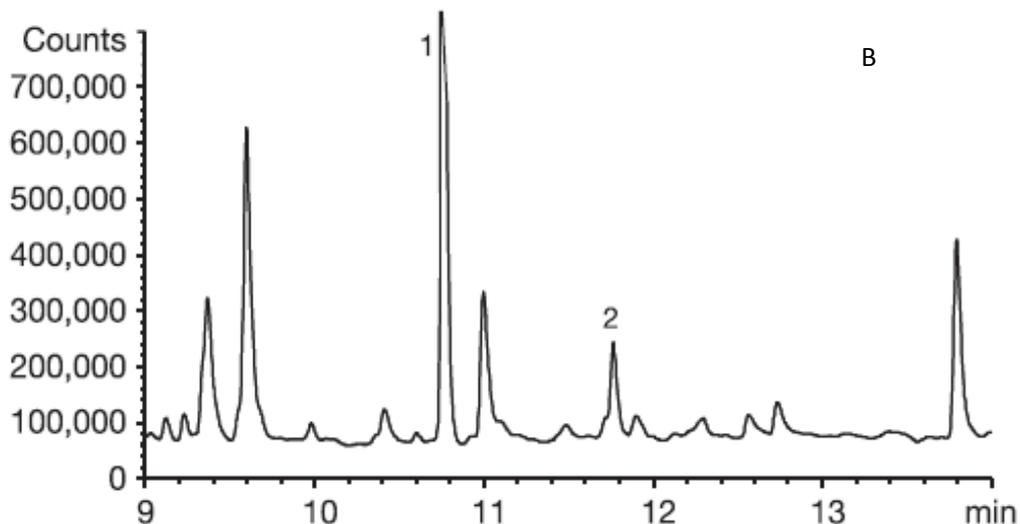
¹¹ RAMESH, A., BALASUBRAMANIAN, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, fipronil and trifluralin in aqueous buffer solutions. *J Agric Food Chem* 47 (1999) 3367- 3371.

¹² PEI, Z., YITONG, L., BAOFENG, L., GAN, J Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. *Chemosphere* 57(2004) 1691-1696.

¹³ MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J Chromatogr A* 982 (2002) 267-273.

¹⁴ JIMÉNEZ, J., BERNAL, J., DEL NOZAL, M., MARTÍN, M., MAYO, R. Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electroncapture detection. *J Chromatogr A* 1146 (2007) 8-16.

¹⁵ SÁNCHEZ, C., MIGUEL, E., TADEO, J. Determination of fipronil in honey and pollen samples by gas chromatography. Proc 11as Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona. 17.(2005) 122 pp.



La figura A muestra la cuantificación con estándar interno con detector ECD y la figura B muestra la cuantificación con detector MS donde el pico 1 corresponde al estándar interno heptacloro y el pico dos corresponde al fipronil.

Mientras el fipronil y sus subproductos han sido encontrados en bajas concentraciones en sólidos, su toxicidad potencial en algunos organismos es relativamente alta (Walorczyk 2008)¹⁶. Por esta razón Wenjian et al.2009¹⁷ Llevaron a cabo un análisis sobre la toxicidad potencial del fipronil en sedimentos haciendo uso de cromatografía de gases con detección de captura de electrones y espectrometría de masas con ionización química negativa (GC-ECD and GC-NCI-MS). Este análisis se realizó con el método de estándar externo, y las muestras colectadas fueron sometidas a extracción líquido-líquido para la obtención del analito.

Vilchez y colaboradores (2001)¹⁸ realizaron la determinación de fipronil en agua, sólidos y orina humana, mediante la técnica de extracción SPME en inmersión y las técnica analítica cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa para realizar el seguimiento de este insecticida controlando variables como el pH, temperatura de adsorción y de desorción térmica con el fin de obtener la mejor respuesta motivando a posteriores análisis de toxicología. La cuantificación de este compuesto se llevó a cabo mediante el método de estándar interno para lo

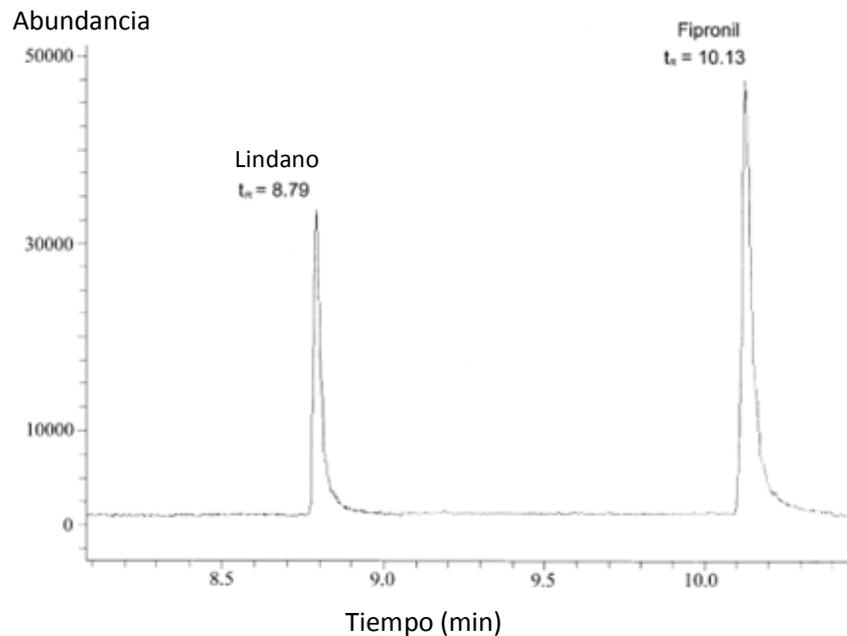
¹⁶Walorczyk, S., Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. *Journal of Chromatography A*, 1208 (2008) 202–214

¹⁷WENJIAN, L., TSUKADA, D., GREENSTEIN, L., BAY, S., MARUYA S. Analysis, occurrence, and toxic potential of pyrethroids and fipronil in sediments from the Ballona Creek estuary. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, (2009) 277-289.

¹⁸ VILCHEZ, J., PRIETO, J., ARAUJO, L., NAVALO, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919 (2001) 215–221

cual se utilizó lindano. En la figura 2 se muestra un cromatograma para la cuantificación realizada.

Figura 2. Cromatograma de cuantificación de fipronil mediante estándar interno (lindano). Tamado de Vilchez et al. (2001)



Debido a los potenciales efectos que poseen el fipronil y sus residuos sobre el ambiente y en humanos dado que esta sustancia actúa interfiriendo en el transporte de iones Cl^- a través de las membranas de las neuronas al inhibir a su receptor (ácido gamaaminobutírico). La formación de los residuos de fipronil y algunas de sus características se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Característica del fipronil y algunos de sus derivados.

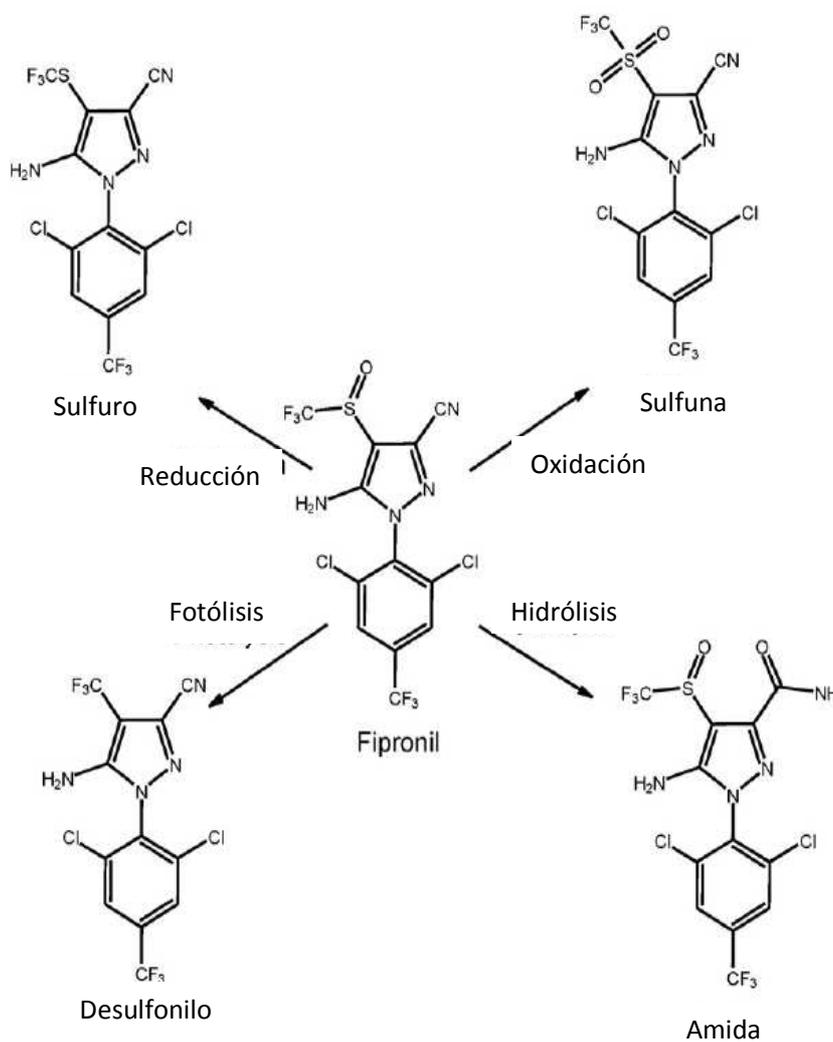
Nombre	Coeficiente ¹⁹		Formación ²⁰
	Koc	log Kw	
Fipronil	803	4,01	-
Desulfinilfipronil	1,290	-	Fotólisis en agua o sólido
Sulfuro de Fipronil	2,719	-	Reducción en sólido (anaeróbico)
Sulfona de Fipronil	4,209	-	Oxidación en sólido (aeróbica)

¹⁹ ROHONE-POULENC. Fipronil: research triangle park, N. C., World Wide Technica Bulletin p.p. 21

²⁰ CONNELLY, P., Environmental fate of fipronil: California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation (2002)

Bichon et al. 2008²¹, evaluaron la concentración plásmica de residuos de fipronil (sulfono, sulfido, fipronil, desulfonil y amido) en ovino, en el esquema 5 se muestra la formación de residuos de fipronil. Se desarrolló una metodología basada en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para lo cual se empleo la técnica de extracción en fase sólida para la preparación de la muestra. Para esta validación se utilizaron estándares de alta pureza de los analitos de interés y se procesaron 96 muestras.

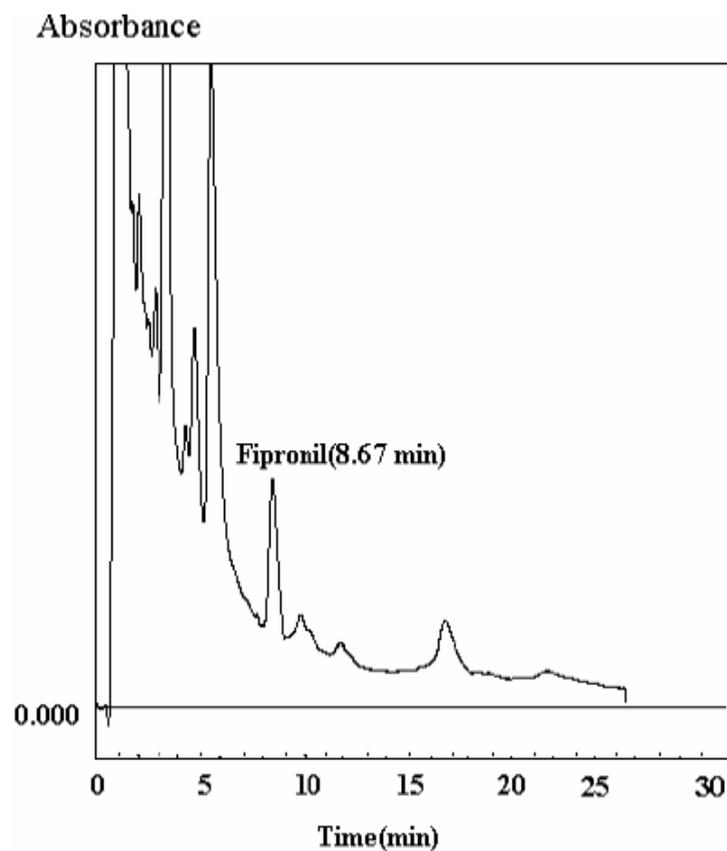
Esquema 5. Formación de residuos de fipronil.



²¹ Bichon, E., Richard, E., Le Bizeca, B. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1201 (2008) 91–99

- Determinación de fipronil mediante cromatografía de líquidos. Mohamad y su grupo²² realizaron la determinación de fipronil en sólidos y en agua pero cambiando la técnica por RP-HPLC con una columna C18 con detección UV a una longitud de onda de 280nm, dicha determinación se realizó mediante la técnica de estándar externo utilizando un patrón de fipronil. Para este estudio se realizó la preparación de la muestra mediante extracción líquido-líquido a diferencia de las técnicas utilizadas en cromatografía de gases. En la figura 3 se muestra el cromatograma obtenido para esta determinación.

Figura 3. Cromatograma de la determinación de fipronil mediante HPLC.



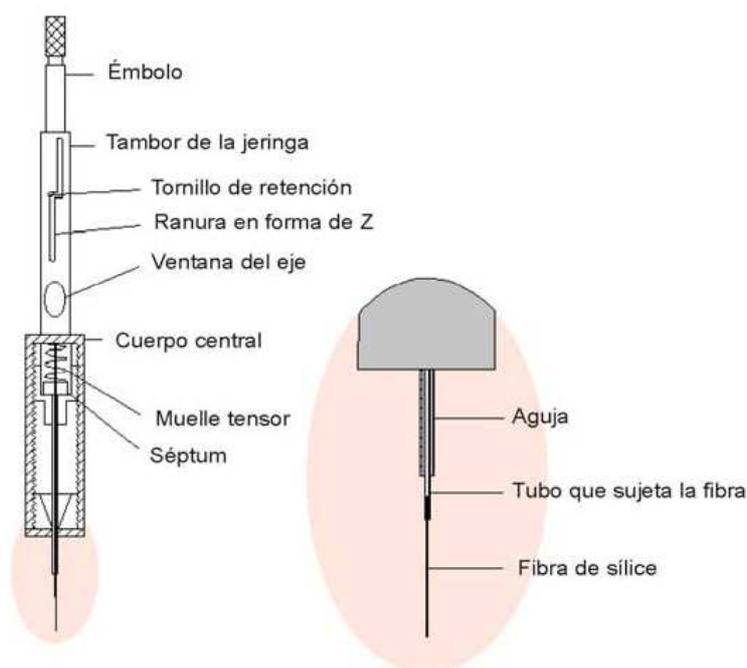
²² MOHAMMAD, R., SEYED, M., KAMYAR, K. Determination of Fipronil Residue in Soil and Water in the Rice Fields in North of Iran by RP-HPLC Method. *Acta Chim. Slov.* 53 (2006) 517–520

1.2. MARCO TEÓRICO

1.2.1. Técnica de extracción

1.2.1.1. Microextracción en fase sólida (SPME). La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico²³. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa; de esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Un esquema del dispositivo comercial de SPME se muestra en la figura 4.

Figura 4. Sistema de dispositivo para la microextracción en fase sólida.

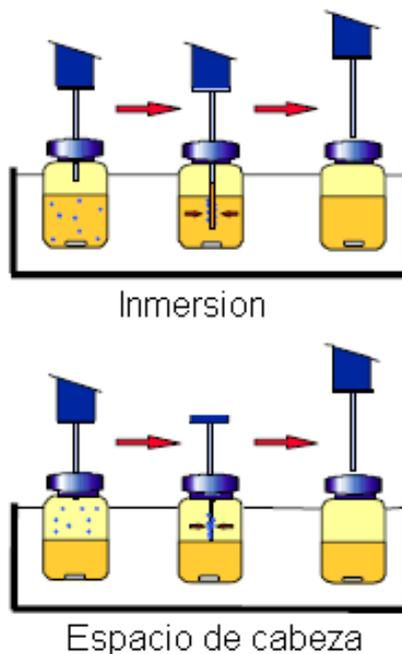


Existen dos formas básicas de realizar la extracción en SPME: extracción por inmersión directa donde se presentan dos fases en equilibrio, la fase líquida que es la que contiene los analitos y la fase sólida de la fibra; por espacio de cabeza donde hay tres fases en equilibrio, las mencionadas anteriormente y la fase

²³ ALPENDURADA, M. J. Chromatogr. A, 889 (2000) 3.

gaseosa que es la que contiene a los analitos, la fibra no se sumerge dentro de la solución.²⁴ En la figura 5 se muestra una ilustración de dichos proceso.

Figura 5. Tipos de microextracción en fase sólida.



1.2.2. Técnicas cromatográficas

1.2.2.1. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en una fase móvil que en este caso es un líquido. Esta fase se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil y los que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con mayor rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. Esta es una de las técnicas de separación más utilizadas debido a su alta sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, separación de especies no volátiles o lábiles, entre otras.²⁵

²⁴ PAWLISZY, J., Solid phase microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, 1997.

²⁵ SKOOG, D. LEARY, J. Análisis instrumental. 4ª edición. Madrid: Mc Graw Hill, 1995, 675, 731

1.2.2.2. Detección de arreglo de diodos. Este detector suministra información más completa que un UV de longitud de onda fija ya que registra simultáneamente la señal del analito a diferentes longitudes de onda. Proporciona información en tres dimensiones: tiempo, absorbancia y longitud de onda. Estos detectores emplean un policromador que dispersa el espectro de luz de la lámpara después de atravesar la celda del detector siendo así evaluadas simultáneamente la luz de todas las longitudes de onda por un conjunto de diodos. La resolución del detector depende del número de diodos y del intervalo de longitudes cubierto. Su sensibilidad es alta. Estos detectores permiten frecuentemente obtener información cualitativa sobre la estructura de los analitos a través de sus espectros UV y confirmar la pureza de los picos permitiendo determinar si se trata de un único componente.²⁶

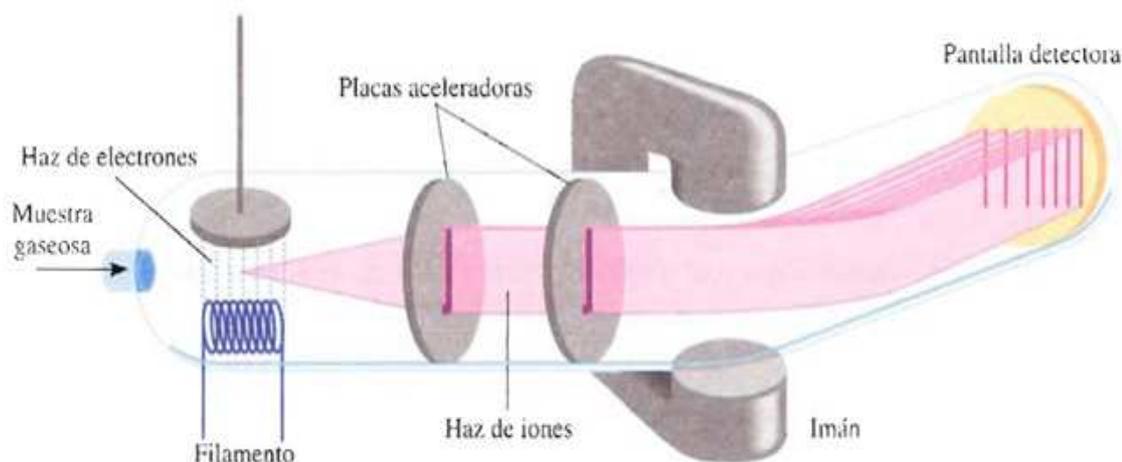
1.2.2.3. Cromatografía de gases. En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He), el cual no debe reaccionar con la muestra para no intervenir en la separación. En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna, actualmente las más empleadas son las columnas capilares debido a que presenta ventajas como el hecho de que se necesita poca cantidad de muestra, posee un diámetro interno y tamaño de partícula pequeños lo que hace que la altura del plato teórico no se modifique drásticamente con valores distintos de velocidad de flujo. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados.²⁷

1.2.2.4. Espectrometría de masas. Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas, en la figura 6 se muestra el sistema de ionización. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía.

²⁶ GROB, K., LÄUBLI, T. *HRC CC 9: 518* (1986)

²⁷ DAVRIO, M., BLANCH, G., CIFUENTES, A., DIEZ, J., DE FRUTOS, M., HERRAIZ, M., MARTINEZ, I., SANZ, J. *Cromatografía y electroforesis en columna*. Edición 1ª. Springer-Velarg Ibérica. Barcelona. 2000

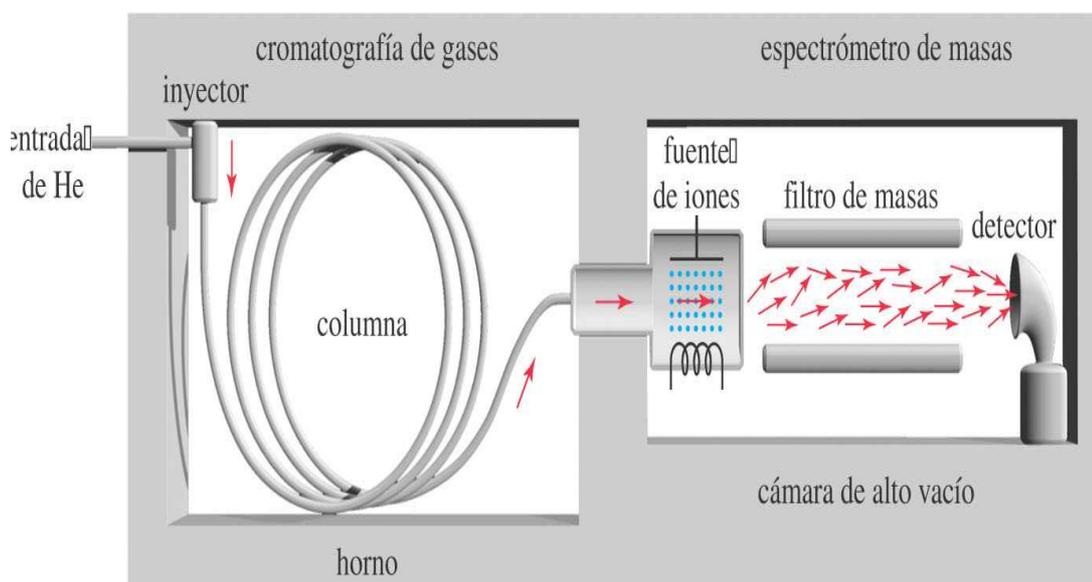
Figura 6. Sistema de ionización de espectrometría de masas.



El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. Esta técnica posee una alta sensibilidad, del orden de ppm o mg.L^{-1} y en casos específicos hasta ng.L^{-1} .

1.2.2.5. Acoplamiento cromatografía de gases- espectrometría de masas. El acoplamiento de las técnicas se muestra en la figura 7, GC (Cromatografía de Gases) y MS (Espectrometría de Masas) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío dado que en la etapa de separación de masas las colisiones intermoleculares reducirían la resolución, el uso de un gas inerte altamente purificado como portador reduce el problema de la contaminación de la muestra, pero sigue la necesidad de eliminarlo en la cámara de ionización y en el analizador, por lo tanto este acoplamiento requiere sistemas especiales de conexión que permitan conseguir estas condiciones rápidamente.

Figura 7. Acoplamiento de cromatografía de gases con espectrometría de masas.

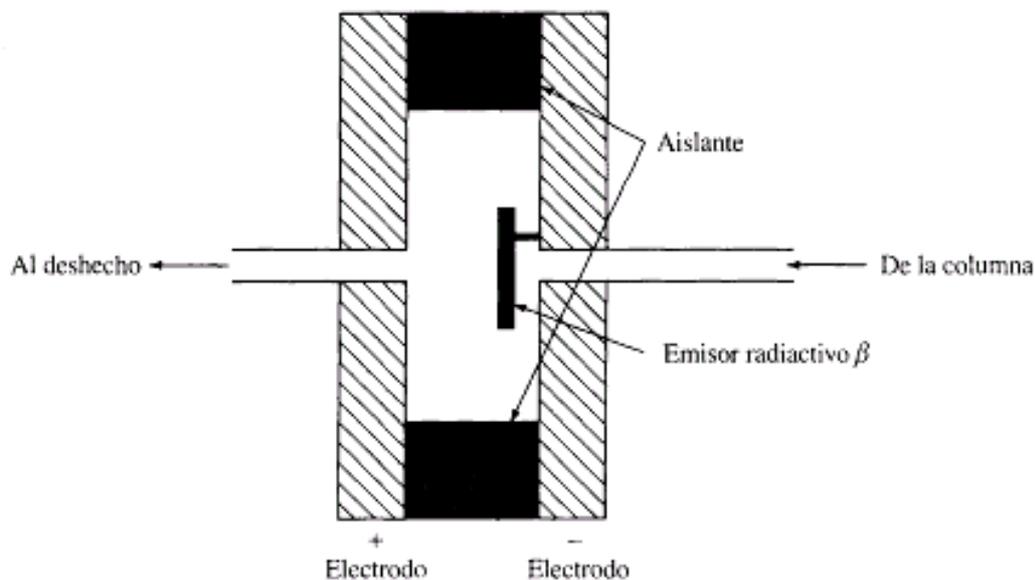


1.2.2.6. Detección de microcaptura de electrones. El detector de microcaptura de electrones (μ ECD) mostrados en la figura 8 se utiliza en la identificación de compuestos con grupos electronegativos debido a su sensibilidad y especificidad. El μ ECD utiliza un elemento radiactivo de baja intensidad, emisor de partículas beta constituidas por electrones (generalmente ^{63}Ni). Si se establece una diferencia de potencial entre los electrodos ($<20\text{V}$), los electrones serán "lentos", condición que es favorable por los choques elásticos que se producen con las moléculas del gas portador, por lo general nitrógeno o una mezcla 5% metano y 95% argón. Cuando las moléculas del analito llegan a la cámara, encuentran un plasma de electrones lentos entre los dos electrodos, al capturar algunos de estos electrones se forman iones negativos más pesados, que son más lentos que los electrones y la corriente de fondo disminuye. La respuesta varía mucho de unos compuestos a otros y eso favorece la detección de organoclorados en presencia de otros compuestos que contengan solamente C, H y O.

El μ ECD es 1000- 100000 veces más sensible que FID, y un millón veces más sensible que un TCD, su uso más grande es en el análisis de compuestos halogenados. Puede detectar hasta ng.L^{-1} .²⁸

Figura 8. Sistema de detección de microcaptura de electrones.

²⁸ PELLIZZARI, E. "Detección de captura de electrón en cromatografía de gas. *Diario de la cromatografía A* 98(2)(1998) 323-361.



1.2.3. Técnica de cuantificación por estándar interno. El estándar interno es un compuesto que se adiciona a todas las muestras a analizar en una concentración conocida y en cantidad suficiente para ser determinado. Entre las características de un buen estándar están: no debe causar ninguna interferencia en el análisis y la señal que este proporciona debe ser similar a la del analito pero debe poder distinguirse, en cromatografía se interpreta como un tiempo de retención distinto.

El método se basa en que las señales del estándar interno y del analito responden a las fluctuaciones del método y del instrumento empleado, entonces la razón de estas señales es independiente de tales fluctuaciones, de esta forma el método compensa por errores provenientes de la manipulación de la muestra.²⁹

Básicamente los factores de respuesta en cromatografía se obtienen de la relación

$$\frac{A_i}{C_i} = F_i \left(\frac{A_{patrón}}{C_{patrón}} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde el factor de respuesta F del detector a una sustancia es una constante que correlaciona el área A con la concentración C.

Este método se emplea normalmente en curvas de calibración donde se usan concentraciones fijas de estándar interno e incrementos de la concentración del

²⁹CASTILLO, J. Aplicación del método del estándar interno a la Cromatografía de Gases. Agosto 2003. P.p 2 - 3

analito en las soluciones, al ser inyectadas las soluciones se obtiene la relación entre las áreas de analito y estándar interno las cuales se grafican versus la relación de sus concentraciones como se muestra en el ecuación 2. La pendiente de esta gráfica corresponde al factor de respuesta F proporcionado por el detector.³⁰

$$F = \frac{A_x / A_{Istd}}{C_x / C_{Istd}}$$

Ecuación 2

³⁰CASTILLO, J. Aplicación del método del estándar interno a la Cromatografía de Gases. Ibid. p.3

2. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA EMPRESARIAL

2.1 FASE DE ENTRENAMIENTO

2.1.1. Entrenamiento en Microextracción en fase sólida (SPME). Para el desarrollo y aprendizaje de esta técnica inició con inducción del procedimiento que se debe realizar y los tipos de fibra que pueden ser utilizados para este sistema. El adiestramiento de la técnica tuvo lugar en el apoyo para el desarrollo de la validación de determinación de Trihalometanos en aguas destinadas para el consumo mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) y cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones, para esto se utilizó una fibra azul de polidimetilsiloxano bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio. El tiempo correspondiente al aprendizaje de dicha técnica fue de 20 horas en conjunto con la primera parte del adiestramiento en cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones. Esta validación se desarrollo teniendo en cuenta el interés de la empresa EMPOPASTO S.A. E.S.P. por cuantificar la carga orgánica presente en el afluente y efluente del agua en el proceso de potabilización.

La determinación del flujo óptimo del gas de arrastre (Nitrógeno) se determinó empleando la ecuación de Van Deemter el cual fue de $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ mostrando como pico de referencia al bromodictlorometano.

Para la validación de la técnica analítica instrumental se empleó la metodología del Water Research Center WRC del Reino Unido (acogida en Colombia por el IDEAM y el INS) que consiste en un análisis de variabilidad mediante ANOVA representado en el ensayo de cinco soluciones entre blancos de ensayo, estándares, muestras y muestras dopadas por duplicado durante seis días, buscando evaluar los atributos característicos tales como linealidad (RDL entre $5\text{-}200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), precisión ($< 15\%$), exactitud ($> 83\%$) y detección ($\text{LD} < 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y que permitió establecer la confiabilidad del método.

2.1.2. Entrenamiento en cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Esta fase se inició con una capacitación en el manejo de un equipo HPLC-DAD propiedad del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Caldas, equipado con software LC-Solutions, marca Shimadzu, bomba cuaternaria, horno para calentamiento de columna y con detector de arreglo de diodos y Columna C-18 como se muestra en la figura 9. Dicho entrenamiento tuvo lugar durante los 3 primeros meses de permanencia en la

ciudad de Manizales, incluyendo una capacitación sobre la instalación, manejo del software y usos del instrumento HPLC semipreparativa con software LC-Solutions, marca Shimadzu con detector de índice de refracción y detector UV dada en la Universidad Nacional.

En la ciudad de Cali se realizó un curso sobre el manejo del software y usos del instrumento mencionado dada por la empresa Purificación y Análisis de Fluidos (PAFLTDA) representante de la marca Shimadzu en Colombia.

Algunas de las técnicas que lograron ser estandarizadas en el equipo de cromatografía líquida son: Determinación de residuos de tetraciclinas en carne, determinación de hecogeninas en jugo de fique, las cuales se describen en la sección de anexos.

Figura 9. HPLC-DAD.



2.1.3. Entrenamiento en cromatografía de gases (GC). Dicho entrenamiento se realizó en dos fases: Cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones (μ ECD) y detección de ionización con llama (FID). Haciendo uso de del equipo de cromatografía de gases Agilent AT 6890 con dos detectores, un detector ^{63}Ni μ ECD y un FID como se muestra en la figura 10.

Figura 10. Cromatógrafo de gases con detectores μ ECD y un FID.



La etapa de entrenamiento en el manejo de los equipos de cromatografía de gases se realizó durante 2 meses en los cuales se estandarizaron algunas técnicas como: el seguimiento de la reacción de acoplamiento C–C tipo Sonogashira entre fenilacetileno y clorobenceno para la formación de difenilacetileno, determinación de metano en líquido ruminal de vaca, las cuales se describen en la sección de anexos.

2.2. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE FENOL Y SUBPRODUCTOS DE OXIDACIÓN MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA HPLC

2.2.1. Instrumentación. Estándares: Las soluciones patrón de fenol fueron preparadas a partir de un estándar de fenol con una pureza del 99,5%, disuelto en metanol (grado HPLC) a una concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, el cual fue disuelto en un vial ámbar para una concentración final de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Las soluciones de Hidroquinona, Benzoquinona y Catecol, fueron preparadas a partir de estándares sólidos de estas sustancias con un 99,5% de pureza. Estos se disolvieron en Metanol (grado HPLC) hasta una concentración final de $0,25 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,25 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0,5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

2.2.2. Cromatografía líquida con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD). El análisis de fenol y sus subproductos de oxidación fue realizado con un cromatógrafo líquido HPLC-DAD equipado con software LC-Solutions, marca Shimadzu, bomba cuaternaria, horno para calentamiento de columna y con detector de arreglo de diodos. Columna Waters Spherisorb® 5µm ODS2 (4,6mm x 250mm). Los compuestos de interés fueron determinados bajo las siguientes condiciones. La temperatura del horno fue de 25°C. El volumen de inyección fue 20µL. La temperatura de la celda de detección fue de 25°C.

Fase móvil A: agua acidificada con H₃PO₄ hasta pH de 2,8 B: Acetonitrilo, mezcla isocrática 60:40 respectivamente.

Longitud de onda de detección 210nm/4nm, 220nm/4nm y 240nm/4nm

2.2.3. Métodos. Se prepararon varias soluciones de concentración conocida de fenol a partir de la solución patrón preparada inicialmente, se inyectaron en el cromatógrafo 20µL de estas con el fin de determinar el tiempo de retención.

Se ensayaron fases móviles tales como A: agua acidificada con H₃PO₄ hasta pH de 2,8 B: Metanol, mezcla isocrática 60:40 respectivamente

A: agua acidificada con H₃PO₄ hasta pH de 2,8 B: Acetonitrilo, mezcla isocrática 70:30 respectivamente

A: agua acidificada con H₃PO₄ hasta pH de 2,8 B: Acetonitrilo, mezcla isocrática 65:35 respectivamente.

Después de escogida la fases móvil, se llevó a cabo el mismo procedimiento para los estándares de hidroquinona, benzoquinona y catecol. Posterior a esto se preparó una mezcla de los estándares y se inyectó directamente en el cromatógrafo.

Al ser determinados los tiempos de retención de los estándares, se procedió a la realización de las curvas de calibración de cada uno de estos compuestos.

2.2.4. Curva de calibración. Se prepararon 5 soluciones de concentración desde 10 hasta 50 mg·L⁻¹ de fenol las cuales fueron inyectadas en las mismas condiciones de análisis cada una por separado y por duplicado.

Luego se prepararon 5 soluciones de la mezcla de los estándares en concentraciones de 10 a 50 mg·L⁻¹, las cuales fueron inyectadas en las mismas condiciones de análisis y por duplicado.

2.3. DETERMINACIÓN DE FIPRONIL EN LECHE DE VACA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SPME Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.

2.3.1. Instrumentación. Patrón secundario: La solución patrón de fipronil fue preparada de Regent 200 SC disponible comercialmente.

Fibra: se usó un holder para SPME de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Se utilizó una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). La fibra PDMS fue acondicionada durante 30min a 270°C en el puerto de inyección antes de la extracción.

Condiciones de extracción: la fibra acondicionada se sumergió en el vial contenedor en un tiempo estandarizado de 30 minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para la adsorción de los analitos. Después de transcurrido este tiempo se realizó la desorción térmica en el puerto de inyección del cromatógrafo a 270°C durante 5 minutos.

2.3.2. Cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones (GC- μ ECD). El análisis de fipronil fue realizado bajo las condiciones que se describen en la tabla 2. El tiempo total de análisis para cada corrida cromatográfica fue de 24 min.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el detector de μ ECD.

Modulo	Referencia
Referencia del equipo	Agilent AT6890
Automuestreador	Inyección manual
Técnica de preparación de la muestra	SPME
Columna analítica	HP-5 con fase estacionaria de 5%fenil, 95%polidimetilsiloxano (30m x 0.25mm i.d. y 0.25 μ m de espesor de la película) suministrado por Agilent
Gas portador	Nitrógeno (99,99%)
Velocidad de flujo	1,5mL·min ⁻¹ ³¹
Programación del horno	50°C durante 2min, hasta 110°C en un aumento de 20°C·min ⁻¹ hasta 270°C por 5min, post run en 300° (2min)
Inyector	270°C modo split 25:1
Detector	μ ECD 280 °C

³¹ VILCHEZ, J., PRIETO, J., ARAUJO, L., NAVALO, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919 (2001) 215–221

2.3.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. (GC/MS). El análisis fue realizado con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas El compuesto de interés fue determinado bajo las condiciones descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para el detector de MS

Modulo	Referencia
Referencia del equipo	QP2010 PLUS
Automuestreador	Autoinyector
Técnica de preparación de la muestra	SPME
Columna analítica	Columna capilar ZB-5MS, (30m× 0.25mm i.d. and 0.25µm con fase estacionaria de 5%fenil polisiloxano (30m × 0.25mm i.d. y 0.25µm de espesor de la película)
Gas portador	Helio (99,99%)
Velocidad de flujo	1,5mL·min ⁻¹ ³²
Programación del horno	50°C durante 2min, hasta 110°C en un aumento de 20°C·min ⁻¹ hasta 270°C por 5min, post run en 300° (2min)
Inyector	270°C modo Split 25:1
Detector	MS 280 °C

2.3.4. Métodos. Se prepararon varias soluciones de concentración conocida de fipronil comercial a partir de la solución patrón y se inyectaron en el cromatógrafo con el fin de determinar el tiempo de retención, posterior a esto, se preparó una solución de Trihalometanos (THMs) (como estándar interno) conformados por cloroformo (CHCl₃), bromodichlorometano (CHCl₂Br), dibromoclorometano (CHClBr₂) y bromoformo (CHBr₃) en acetona a una concentración de 300 µg·L⁻¹ con el mismo fin bajo las mismas condiciones de análisis. Luego se preparó una solución de fipronil y THMs en acetona a 300 µg·L⁻¹ cada uno.

Después de determinados los tiempos de retención del patrón y el estándar interno para este análisis se combinaron las condiciones de análisis cromatográfico Vilchez et al.³³

³² VILCHEZ, J., PRIETO, J., ARAUJO, L., NAVALO, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919 (2001) 215–221

³³ AGUIRRE, M. "Optimización de la técnica de extracción HS-SPME mediante la metodología de superficies de respuesta para la determinación de subproductos de la desinfección con cloro por cromatografía de gases en aguas de consumo" Investigación en curso, Universidad de Caldas, 2009.

Se escogió dibromoclorometano como estándar interno para la cuantificación de fipronil debido a la respuesta que presentó en análisis previos.

2.3.5. Microextracción en fase sólida (SPME). La solución de fipronil se sometió a SPME bajo las condiciones propuestas por Jimenez et al.³⁴, este procedimiento se realizó también para las soluciones de estándar interno y la mezcla de patrón y estándar interno.

2.3.6. Curva de calibración. Se prepararon 4 soluciones de concentración 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de estándar interno y desde 100 hasta 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fipronil debido a las respuestas dadas por el detector en inyecciones previas a diferentes concentraciones, se midieron 500 μL de cada solución y se sometieron a SPME bajo las condiciones estandarizadas por Vilchez et al.³⁵

2.3.7. Tratamiento de la muestra. Se diluyen 200 μL de leche comercial en 1mL de acetona y se ajustó el pH de esta solución a 10 con hidróxido de amonio (NH_4OH) al 28%. Esta muestra se dopó con una solución de fipronil y patrón interno (THMs) para una concentración final de 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}$ y 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}$ respectivamente. Posterior a esto se medieron 500 μL en un vial y se sometieron a SPME en las condiciones descritas anteriormente.

³⁴ JIMENEZ, J., BERNAL, M., NOZAL, M., MARTIN, T., MAYO, R. Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1187 (2008) 40–45.

³⁵ VILCHEZ, J., PRIETO, J., ARAUJO, L., NAVALO, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919 (2001) 215–221

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección están discutidos los aspectos correspondientes a los objetivos planteados para esta pasantía en lo que se refiere a la estandarización de las técnicas cromatográficas para el análisis de fenol y sus subproductos primarios de oxidación y al análisis de fipronil.

3.1. FENOL Y SUBPRODUCTOS PRIMARIOS DE OXIDACIÓN.

Los seguimientos de la oxidación de fenol que se han realizado mediante cromatografía líquida involucran a los subproductos primarios de la oxidación, los cuales aun no han sufrido apertura del anillo aromático, esto se debe a la alta estabilidad que presentan dichas sustancias como lo son la hidroquinona, benzoquinona y catecol.³⁶

3.1.1. Curvas de calibración. En análisis previos se encontró que los tiempos de retención del fenol, hidroquinona, benzoquinona y catecol en las condiciones de trabajo expuestas anteriormente son los que se reportan en la tabla 4.

Tabla 4. Determinación de los tiempos de retención del fenol y sus subproductos primarios de oxidación.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Hidroquinona	3.049 ± 0.080
Catecol	3.436 ± 0.092
Benzoquinona	3.912 ± 0.015
Fenol	4.819 ± 0.032

Dada la baja polaridad que presenta el tipo de columna utilizada para este análisis es de esperarse que los picos obtenidos para cada compuesto mantengan cierta cercanía entre ellos dada su estructura, sin embargo fue posible lograr la separación de estos con la mezcla de solventes que se utilizó en el análisis.

³⁶ MATTA, R., HANNAA, K., CHIRON, S. Oxidation of phenol by green rust and hydrogen peroxide at neutral pH. *Separation and Purification Technology* 61 (2008) 442–446

Para dicha separación se reportan factores de selectividad y de capacidad y resolución de la columna:

Factor de ecuación 3 de capacidad $k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$

Factor de selectividad 4 $\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$ o $\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$ ecuación

En la tabla 5 se muestran los factores de capacidad para cada analito y los factores de selectividad entre los tomados como A y B

Tabla 5. Factores de capacidad y selectividad de los cuatro analitos de interés

Compuesto	k'_A	A
Hidroquinona	0.604	1.337
Catecol	0.808	1.310
Benzoquinona	1.059	1.050
Fenol	1.536	-

Con los resultados del factor de capacidad de los analitos puede inferirse que el orden de migración de estos no va a cambiar manteniendo las mismas condiciones debido a que mientras mayor sea el valor de este factor, menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna

En cuanto al factor de selectividad, dado que relaciona los factores de capacidad entre dos analitos, se habla específicamente de la separación entre ellos. Si $\alpha > 2$ se obtiene una mala separación ya que son necesarios periodos muy largos para realizarla y si $1 < \alpha < 2$ se obtiene una buena separación cromatográfica.

Para este caso se obtuvieron valores en el rango entre 1 y 1.337, lo que significa que se obtuvo una buena separación en periodos de tiempo cortos.

Resolución: 5 $R_s = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$ ecuación

El valor de la resolución obtenido para este caso fue de 1.576 y puede observarse directamente sobre el cromatograma. Se tiene una buena resolución si los picos

no se solapan, y está perfectamente delimitado cada pico, sin que coincida el final de uno con el principio del siguiente.

En cromatografía se considera que si el valor de la resolución está próximo a 0,7 se obtiene una mala resolución quedando los picos solapados, de forma que se distinguen las crestas, pero no la base, y si el valor de la resolución está próximo a 1,5 se obtienen picos bien delimitados por lo que se obtiene una buena resolución. Por consiguiente puede decirse que la resolución es buena para este método.

La validación del método lleva consigo la realización de las curvas de calibración para cada compuesto a la longitud de onda de cada uno por separado, los datos obtenidos para los analitos se reportan en la tabla 6.

Tabla 6. Características analíticas para el método

Compuesto	Rango lineal (mg·L ⁻¹)	Ecuación de la recta	Linealidad R ²	Limite de detección (mg·L ⁻¹)	Limite de cuantificación (mg·L ⁻¹)
Fenol	10 - 50	y = 118227x - 180493	0.9989	1,54	5,15
Benzoquinona	10 - 50	y= 389054x + 430745	0.9941	3.64	12.14
Hidroquinona	10 - 50	y = 54077x + 18383	0,999	0,20	0,66
Catecol	10 - 50	y = 12255x + 92051	0.9959	3.91	13.02

Para la curva de calibración del fenol fue necesario eliminar un punto de los cinco tomados en cuenta (concentración 50 mg·L⁻¹) esto debido a que para realizar la regresión lineal y obtener valores bajos de límites de detección y cuantificación, se necesita un coeficiente de determinación muy cercano a uno y además para la construcción de una curva de calibración se requieren mínimo 4 puntos en la recta; este método de ajuste de las gráficas se utilizó en todas las regresiones lineales por las razones previamente descritas. Para la de la hidroquinona, el punto 3 (concentración 30 mg·L⁻¹) al igual que para el catecol y la benzoquinona.

Fue posible cuantificar fenol y catecol a una longitud de onda de 210nm dado que presentan un máximo de absorbancia en este punto tal como se muestra en las figuras 19 y 20, sin embargo, la benzoquinona se cuantificó a 240nm que es su máximo de absorbancia como se muestra en la figura 22 y la hidroquinona a 220 dado que aquí presentan su máximo de absorción como se muestra en la figura 21 mientras que 210nm la intensidad de los picos es muy baja y puede confundirse con ruido del instrumento.

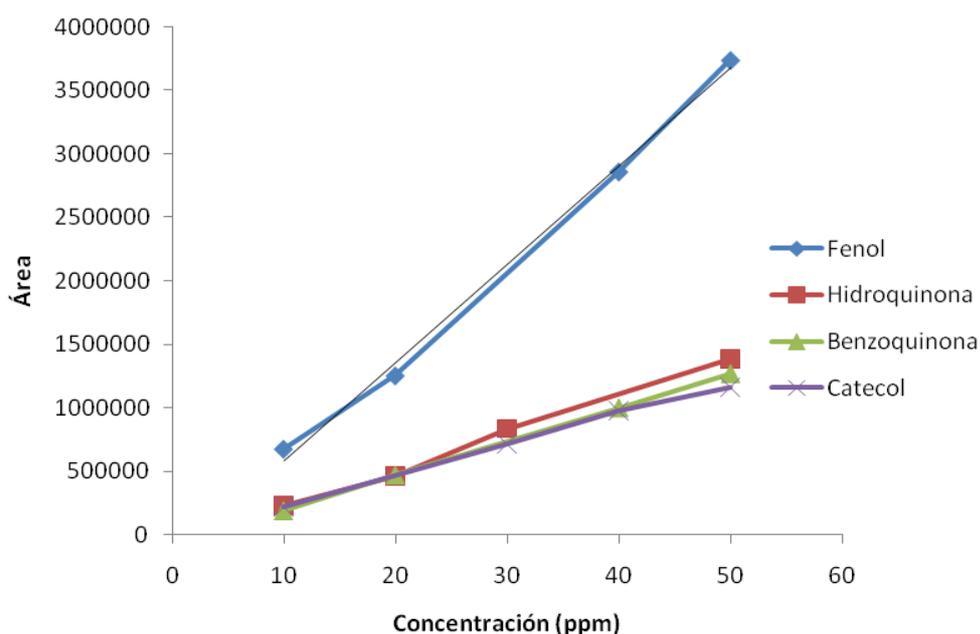
En la realización de curvas de calibración de la mezcla de los cuatro compuestos con la misma concentración cada uno, se observa que las áreas son distintas en varias unidades de magnitud, esto se presenta debido a que los máximos de absorbancia para los cuatro analitos son distintos entre sí como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Longitudes de onda de máxima absorbancia para los analitos de interés.

Compuesto	Longitud de onda (nm)
Fenol	210
Benzoquinona	240
Hidroquinona	220
Catecol	211

De este análisis fue posible el procesamiento de los datos obtenidos para generar las curvas de calibración para cada compuesto en la mezcla de estándares, las cuales se presentan en la figura 11.

Figura 11. Curva de calibración a 210nm de longitud de onda de detección



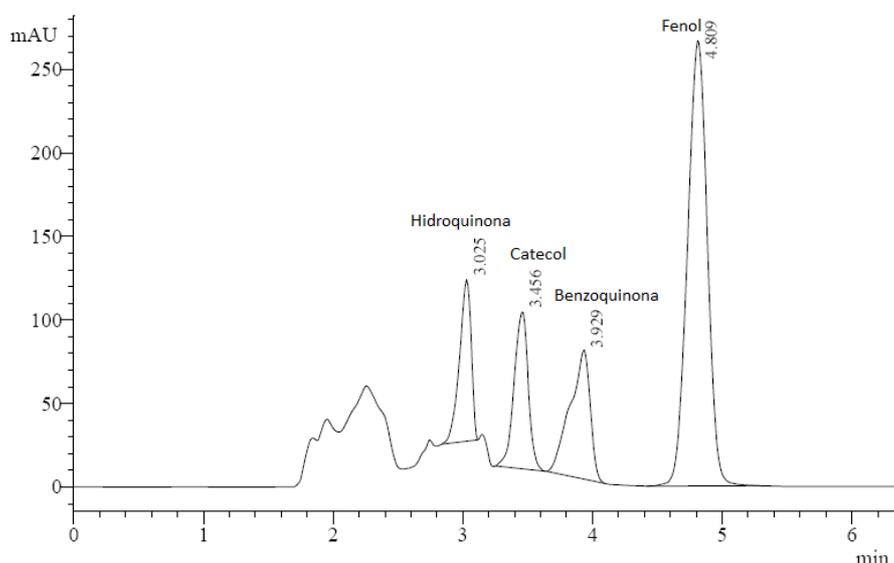
En la generación de estas curvas de calibración fue necesario eliminar el punto 3 correspondiente a 30 mg L⁻¹ para la obtención de la curva del fenol, punto 4 correspondiente a 40 mg L⁻¹ para la hidroquinona, punto 3 para la benzoquinona y punto 2 correspondiente a 20ppm para el catecol. En la tabla 8 se muestran las ecuaciones correspondientes con su respectivo coeficiente de correlación.

Tabla 8. Ecuaciones resultantes para las curvas de calibración de los cuatro compuestos a 220nm como longitud de onda de detección

Compuesto	$y = ax + b$	R^2
Fenol	$y = 77364x - 150160$	0,9958
Benzoquinona	$y = 25247x - 77126$	0,9998
Hidroquinona	$y = 36576x - 120743$	0,9956
Catecol	$y = 17515x + 49790$	0,997

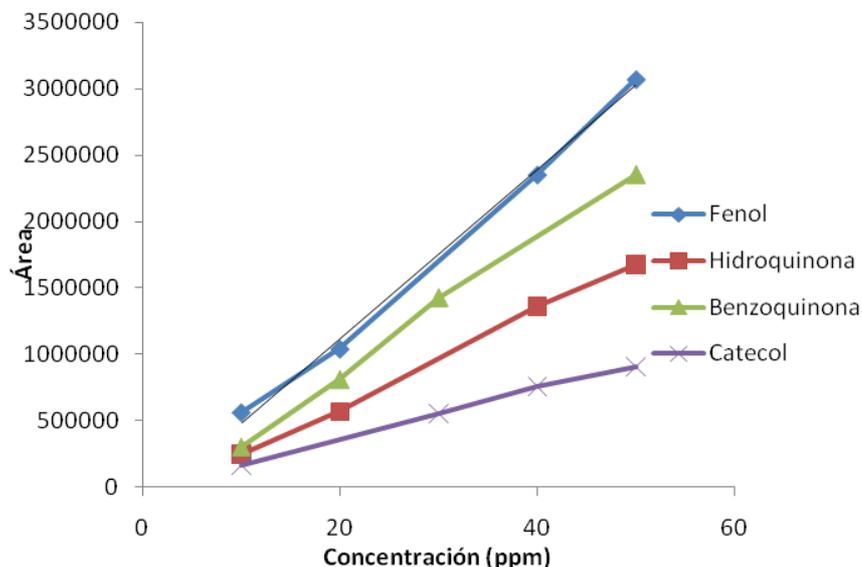
Para esta longitud de onda de trabajo que corresponde al máximo de absorbancia del fenol, se presentan señales claras, sin embargo las intensidades de estas señales no son muy altas a excepción del fenol como se muestra en la figura 12, por lo tanto se hace dispendiosa la identificación y cuantificación de estos compuestos en concentraciones muy bajas aunque los picos que se presentan tienen una buena resolución, por lo tanto es posible utilizar esta longitud de onda de trabajo para la identificación de los cuatro analitos.

Figura 12. Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos a 210nm.



El procedimiento llevado a cabo a la longitud de onda de 220 nm dio como resultado las curvas de calibración que se presentan en la figura 13.

Figura 13. Curva de calibración a 220nm de longitud de onda de detección



Para las gráficas anteriores fue necesario eliminar el punto 3 para el fenol y la hidroquinona, punto 4 para la benzoquinona y punto 2 para catecol. En la tabla 9 se reportan las ecuaciones de la curva y los coeficientes de correlación de cada una.

Tabla 9. Ecuaciones resultantes para los cuatro compuestos a 220nm como longitud de onda de detección

Compuesto	$y = ax + b$	R^2
Fenol	$y = 63406x - 146407$	0,9961
Hidroquinona	$y = 36576x - 132676$	0,9982
Benzoquinona	$y = 51537x - 192513$	0,9968
Catecol	$y = 18760x - 12458$	0,9971

Para esta longitud de onda de trabajo que corresponde al máximo de absorbancia de la hidroquinona, se presentan señales claras, sin embargo las intensidades de estas señales no son muy alta aunque son de alturas similares entre sí como se muestra en la figura 14, por lo tanto es posible utilizar esta longitud de onda como canal de cuantificación de estos compuestos en el rango de concentraciones en el cual se trabajó.

Figura 14. Cromatograma de la mezcla de los cuatro compuestos a 220nm.

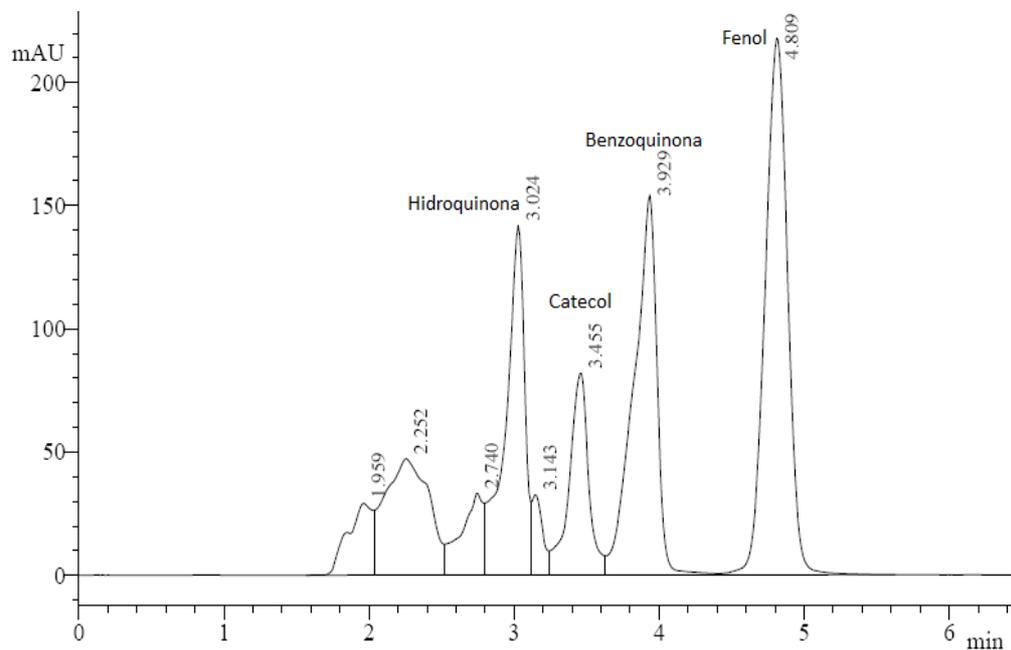
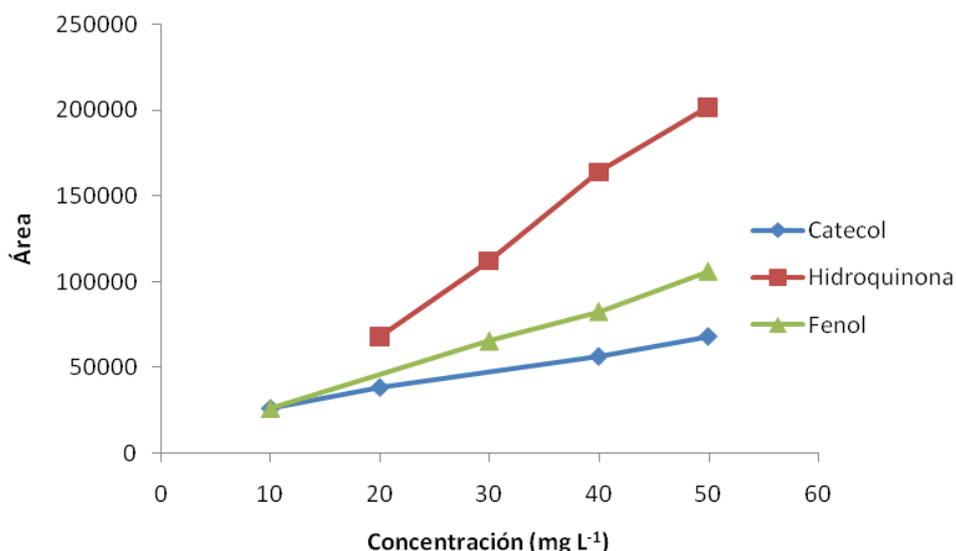
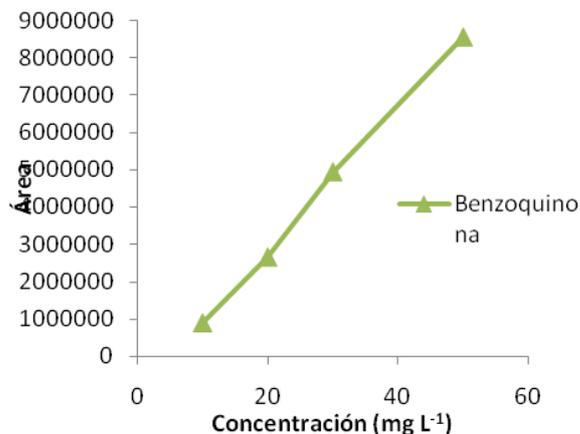


Tabla 10. Curva de calibración de los cuatro compuestos a 240nm.

FENOL		BENZOQUINONA		HIDROQUINONA		CATECOL	
(mg L ⁻¹)	(mv*min)						
10	26340	10	901400	10	52039	10	26124
20	39749	20	2661959	20	67905	20	38356
30	65530	30	4944828	30	112410	30	41024
40	82615	40	5983460	40	164235	40	56467
50	106092	50	8546604	50	202027	50	68064

Las curvas de calibración se muestran en la figura 15.

Figura 15. Curvas de calibración de los cuatro compuestos a 240nm.



Cada una de las series corresponde a un compuesto en la mezcla. En la tabla 11 se reportan las ecuaciones de la curva y los coeficientes de correlación de cada una.

Tabla 11. Ecuaciones resultantes para los cuatro compuestos a 240nm como longitud de onda de detección

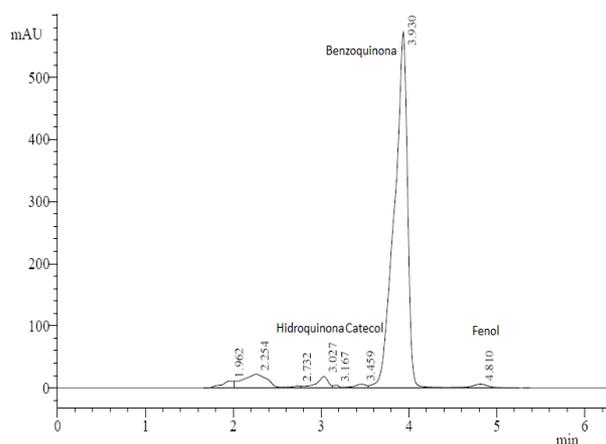
Compuesto	$y = ax + b$	R^2
Fenol	$y = 1965,4x + 6267,9$	0,9977
Benzoquinona	$y = 193053x - 1E06$	0,9979
Hidroquinona	$y = 4541,9x - 22323$	0,9967
Catecol	$y = 1019,9x + 16655$	0,9968

En este caso se hizo necesario eliminar el punto 3 para el fenol, punto 1 para la hidroquinona, punto 4 para la benzoquinona y punto 3 para el catecol.

Según los resultados obtenidos de las respuestas que presentan los cuatro compuestos son diferentes dependiendo de la longitud de onda a la que se trabajó como es de esperarse. Las respuestas que presentaron cuando se prepararon las soluciones de los estándares puros y cuando se prepararon en la mezcla también cambiaron significativamente ya que disminuyeron las intensidades de las señales de todos los compuestos de interés, esto se relaciona tanto con la longitud de onda de trabajo y con el hecho de que la matriz cambie.

De otra parte se obtuvo que a la longitud de onda de máxima absorbancia de la benzoquinona, la cual presenta un máximo a 240nm con una gran intensidad ya que este es un compuesto coloreado, los otros analitos no presentan respuestas significativas con respecto a esta, por lo tanto sus señales no logran ser claramente identificadas como se muestra en la figura 16.

Figura 16. Cromatograma de la mezcla de compuestos a 240nm.



3.1.2. Validación de resultados

En el proceso de validar los resultados obtenidos en esta determinación se calcularon parámetros estadísticos como desviación estándar de x (S_x), límite de detección de x (LOD_x), límite de cuantificación de x (LOQ_x), límite de detección de y (LOD_y) y límite de cuantificación de y (LOQ_y). Estos parámetros obtenidos se muestran en las tablas 12, 13 14 y 15.

Tabla 12. Parámetros estadísticos para la determinación de fenol.

Longitud de onda (nm)	S_x ^a	LOD_x (mg/L)	LOQ_x (mg/L)	LOD_y ^b (área)	LOQ_y ^c (área)
210 (solo)	0,5758	1,54	5,15	2166,76	428371,71
210	1,6142	4,33	14,44	146350,35	928215,22
220	1,2591	3,45	11,49	72231,40	582387,09
240	1,1254	3,02	10,07	12203,06	26051,74

$$a^*: S_{n-1} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

$$b^*: LD = \mu_n + 3S_{N-1}$$

$$c^*: LC = \mu_n + 10S_{N-1}$$

Tabla 13. Parámetros estadísticos para la determinación de hidroquinona.

Longitud de onda (nm)	$S_x^{a^*}$	LOD x (mg/L)	LOQ x (mg/L)	LOD ^{b*} y (área)	LOQ ^{c*} y (área)
220 (solo)	0,0735	0,20	0,66	194501,01	219384,51
210	1,5564	4,18	13,92	35572,35	324357,09
220	1,4770	3,96	13,21	25986,27	361501,76
240	1,0159	2,73	9,09	-9941,72	18947,01

Tabla 14. Parámetros estadísticos para la determinación de benzoquinona.

Longitud de onda (nm)	$S_x^{a^*}$	LOD x (mg/L)	LOQ x (mg/L)	LOD ^{b*} y (área)	LOQ ^{c*} y (área)
240 (solo)	1,3570	3,64	12,14	1847406,57	5152951,41
210	0,3073	0,82	2,75	-54569,88	-2664,96
220	1,5961	4,28	14,28	10657,18	510302,90
240	1,0602	2,84	9,48	-496075,71	785360,51

Tabla 15. Parámetros estadísticos para la determinación de catecol.

Longitud de onda (nm)	$S_x^{a^*}$	LOD x (mg/L)	LOQ x (mg/L)	LOD ^{b*} y (área)	LOQ ^{c*} y (área)
210 (solo)	1,4558	3,91	13,02	1400491,66	2509478,05
210	1,2764	3,42	11,42	73008,46	263501,41
220	1,2717	3,41	11,37	51558,55	200931,10
240	1,4230	3,82	12,73	20549,88	29636,90

En cuanto al fenol se observa que el compuesto solo, tiene límites de detección y cuantificación de x bajos, lo cual cambia cuando la matriz varia, es decir cuando este compuesto se encuentra mezclado con los otros analitos. En cuanto a los límites de detección y de cuantificación de y no se tiene un punto de comparación

debido a que las respuestas de los analitos cuando están solos y cuando están en mezclas son distintas en varios órdenes de magnitud.

En lo que respecta a la determinación de hidroquinona se presenta la misma tendencia que se observa con el fenol con esto se infiere que la causa de esta manifestación se debe a la razón expuesta para el caso anterior que trata sobre el cambio de matriz.

Con la benzoquinona se presenta el menor límite de detección y de cuantificación de x para la longitud de onda de máxima absorbancia del fenol, sin embargo el límite de detección y de cuantificación en y son pequeños pero negativos lo que significa que el equipo no detecta este compuesto en el rango de concentraciones escogido por consiguiente se debe aumentar. En cuanto a la longitud de onda de máxima absorción de este analito, se presenta un bajo límite de detección y de cuantificación en x pero el límite de detección en y es negativo pero el de cuantificación es positivo lo que quiere decir que este rango de concentración es aceptable para cuantificar benzoquinona.

Con el catecol se observa que tanto la desviación estándar como el límite de detección y cuantificación en x tienden a ser constantes por lo tanto puede decirse que el efecto de matriz no influye de manera significativa en su determinación. Los límites de detección y de cuantificación de y son distintos debido a que las respuestas de los analitos solos y mezclados son distintas como se observo anteriormente.

3.2. DETERMINACIÓN DE FIPRONIL EN LECHE DE VACA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SPME Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.

En análisis previos se encontró que los tiempos de retención del fipronil y de los patrones bajo las condiciones de trabajo del cromatógrafo son las que se reportan en la tabla 16.

Tabla 16. Determinación de los tiempos de retención del Fipronil y de los estándares.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Fipronil	18.143 ± 0.018
Estándar A	5.171 ± 0.023
Estándar B	12.838 ± 0.010
Estándar C	16.747 ± 0.026
Estándar D	17.567 ± 0.0091

Donde A corresponde al CHCl_3 , B al CHCl_2Br , C al CHClBr_2 y D al CHBr_3 . De los 4 picos de los estándares se escogió el pico C, los datos obtenidos se reportan en la tabla 17.

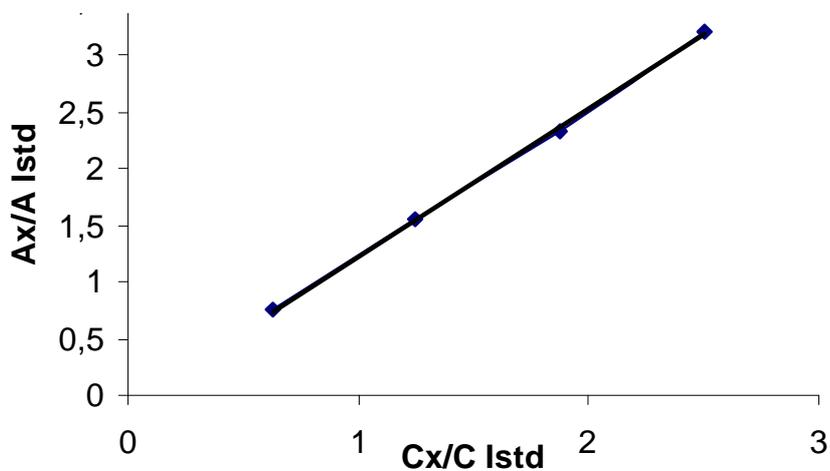
Tabla 17. Curva de calibración por el método de estándar interno.

Cx (ppm)	C _{Istd} (ppm)	A _x	A _{Istd}	t _r patrón (min)	t _r estándar interno (min)*
100	160	16.1	21.1	18.198	16.80
200	160	16.58	10.7	18.177	16.79
300	160	34.43	14.75	18.20	16.78
400	160	33.72	10.49	18.167	16.78

La curva de calibración obtenida se muestra en la figura 17 y para el cálculo del f se utilizó la ecuación

$$\frac{A_x}{A_{Istd}} = f \frac{C_x}{C_{Istd}}$$

Figura 17. Curva de calibración por el método del estándar interno



El factor de respuesta f corresponde a la pendiente de la curva, el valor obtenido de este fue de 1.3023, ($r^2 = 0.9992$). La ecuación para el gráfico de calibración es $y = 1.3023x - 0.00694$. Los valores de f y porcentaje de error para cada solución se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Factores de respuesta para cada concentración de fipronil.

Concentración (ppb)	f	% Error
100	1,2208531	6,2540827
200	1,2396262	4,8125495
300	1,2449266	4,4055476
400	1,285796	1,2672966

Los factores de respuesta obtenidos para cada concentración tienen una desviación estándar igual a 0,027355. Lo cual muestra que estos datos garantizan reproducibilidad y repetibilidad en el análisis.

3.2.1. Microextracción en fase sólida de la muestra de leche dopada con fipronil. De acuerdo con resultados previos a esta investigación es necesario ajustar el pH a 10 antes de llevar a cabo el SPME dado que en la validación realizada por Vilchez et al.³⁷, y Jimenez et al.³⁸, en estas condiciones se presenta mayor eficiencia en la extracción.

Se ajustó a 10 el pH de la leche según la metodología de Vilchez et al., dado que a este valor se produce una mayor adsorción y se evita que se forme un precipitado de las proteínas y de la grasa presente en ella en el momento de la adición de fipronil a la muestra, por esto fue necesario el uso de leche deslactosada.

Se escogió la mezcla de THMs como estándar interno debido a que la técnica fue previamente estandarizada y validada por Cardozo et al.³⁹, trabajo presentado en el I SIMPOSIO INTERNACIONAL AMBIENTAL. Procesos Avanzados de Oxidación.

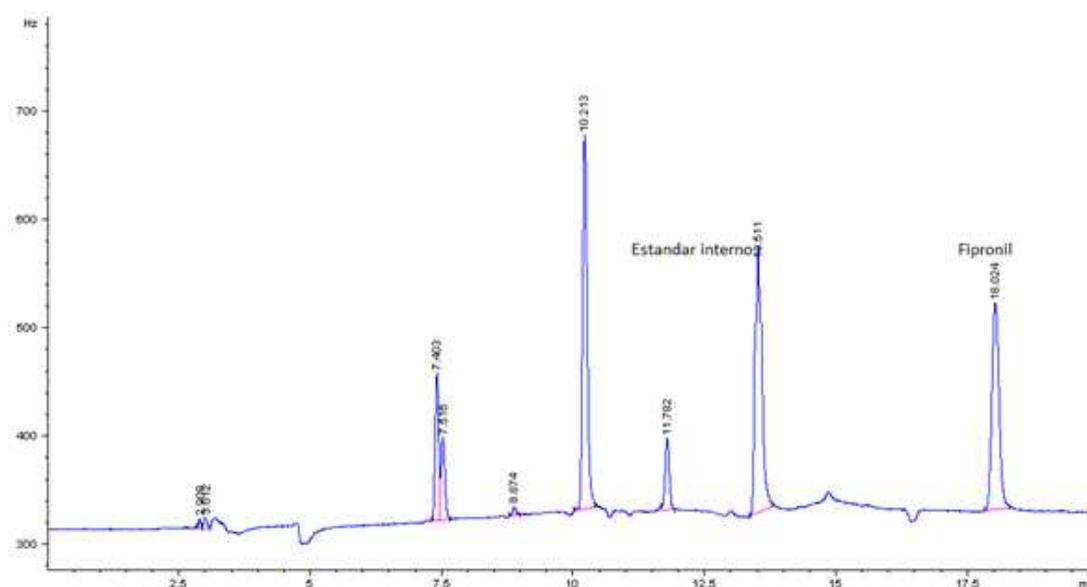
³⁷ VILCHEZ, J., PRIETO, J., ARAUJO, L., NAVALO, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919 (2001) 215–221

³⁸ JIMENEZ, J., BERNAL, M., NOZAL, M., MARTIN, T., MAYO, R. Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1187 (2008) 40–45.

³⁹ CARDOZO, A., CUELLAR, S., ROSERO M, AGUIRRE M. Optimización del flujo según la curva de VAN DEEMTER y validación de la técnica TECNICA HS-SPME GC- μ ECD para la determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano. Investigación en curso, Semillero SIMTA Universidad de Caldas. Departamento de Química Universidad del Quindío (2009)

El cromatograma típico obtenido para este análisis se muestra en la figura 18 donde se ven los picos correspondientes al fipronil y al estándar después de la microextracción llevada a cabo en la matriz.

Figura 18. Cromatograma de la muestra dopada con fipronil y adición de estándares.



Los datos obtenidos para la cuantificación de fipronil en la leche dopada son los que se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Cuantificación de fipronil en una muestra de leche dopada.

Compuesto	Concentración inicial ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Área	t_r (min)*
Fipronil	716.4	79	18.185
Estándar	160	14.96	16.735

A partir de la ecuación 1 se cuantificó la concentración del analito después del dopaje, de esto se obtuvo una concentración final de $649 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que corresponden a un porcentaje de recuperación del $90,58 \pm 4.8\%$.

4. CONCLUSIONES

1. Los cuatro compuestos que fueron analizados: fenol, hidroquinona, benzoquinona y catecol, pueden ser determinados mediante cromatografía líquida con detección de arreglo de diodos pero la longitud de onda de cuantificación difiere entre ellos dado que tienen espectros de absorción diferentes entre sí, por lo tanto el detector DAD confiere una gran ventaja al método en vista de que los analitos pueden ser cuantificados en su longitud de onda de máxima absorbancia.

2. Al analizar los datos obtenidos se puede concluir que a la longitud de onda de 210nm pueden ser identificados claramente los cuatro analitos pero no es posible realizar una cuantificación simultánea de estos a esa longitud de onda ya que las intensidades de la hidroquinona, benzoquinona y catecol son muy

pequeñas comparadas con la del fenol y al bajar la concentración es posible que sus señales se pierdan.

3. La longitud de onda de máxima absorción de la hidroquinona: 220nm puede ser utilizada tanto para identificar como para cuantificar los cuatro analitos de interés ya que la intensidad de los picos de los compuestos es similar.

4. A 240nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción de la benzoquinona, no pueden ser cuantificados los cuatro analitos simultáneamente debido a que la intensidad del pico de la benzoquinona es demasiado alto y no se alcanza a ver los picos de los otros compuestos.

5. Mediante la estandarización de esta técnica se obtuvo un valor de límite de detección para fenol de 1.5 mg.L^{-1} para el rango evaluado de 10 a 50ppm el cual puede ser aplicado en aguas residuales industriales y dada la alta selectividad y sensibilidad mostrada por el método incluso y bajando el rango dinámico lineal se podría adaptar para la evaluación de este contaminante en aguas de consumo.

6. De la mezcla de estándares de trihalometanos para realizar la cuantificación de fipronil por el método de estándar interno, el que mejor da resultados es el dibromoclorometano, debido a que la respuesta que presenta como estándar interno es constante demostrándose en el factor de respuesta que tiene un valor de $1,247 \pm 0,027$.

7. La muestra de leche dopada con fipronil muestra un alto porcentaje de recuperación en concentraciones bajas como se muestra en la sección de resultados, que muestra que es un método plenamente valido para emprender la evaluación en leche de ganado vacuno por la posible intoxicación a que se exponen los consumidores de este producto dadas las condiciones sanitarias de control de garrapatas muy objetables que se están llevando a cabo en municipios ganaderos del Departamento de Quindío.

5. LOGROS ALCANZADOS

- Ponencia oral denominada IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE ORIGEN NATURAL PRESENTES EN AGUA DESTINADAS PARA CONSUMO en el I SIMPOSIO INTERNACIONAL AMBIENTAL. Procesos Avanzados de Oxidación, realizado en la Ciudad de Manizales. Septiembre de 2009
- Ponencia oral aceptada denominada: DETERMINACIÓN DE FIPRONIL EN LECHE DE VACA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN DE MICROCAPTURA DE

ELECTRONES (GC- μ ECD) en el CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA 2010 a realizarse en la ciudad de Cartagena octubre de 2010.

- Ponencia aceptada denominada OPTIMIZACION DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO C-C TIPO SONOGASHIRA MEDIANTE METODOLOGIA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA en el CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA 2010 a realizarse en la ciudad de Cartagena octubre de 2010.

6. RECOMENDACIONES.

- Utilizar los resultados obtenidos del método estandarizado para la determinación de fenol y sus subproductos primarios de oxidación en muestras de agua residual para realizar el seguimiento de remoción de materia orgánica mediante la tecnología CWPO.
- Bajar el rango de medición al orden de ppb y para aplicar esta técnica en determinaciones de materia orgánica de carácter fenólico en muestras de aguas naturales destinadas para potabilización.

- Aplicar los resultados obtenidos del método estandarizado para la determinación de fipronil a una muestra de leche sin ningún procesamiento con el fin de verificar la presencia de este plaguicida en esta matriz.
- Cuantificar fipronil mediante el método de estándar interno utilizando lindano o heptacloro como estándar debido a las estructuras que estos presentan para lograr una mejor respuesta con respecto al analito.
- Complementar la estandarización del método aplicado para el fipronil con la determinación de los residuos de fipronil obtenidos mediante las reacciones este trabajo de grado, mediante cromatografía de gases con detección de microcaptura de electrones y verificar la estructura de cada uno de estos residuos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

BIBLIOGRAFIA

ALPENDURADA, M. *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 3.

ATHILAKSHMI, J., RAMANATHAN S., CHAND D. Facile synthesis of palladium nanoclusters and their catalytic activity in Sonogashira coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* 49 (2008) 5286–5288

BENSALAH, N., TRABELSI, H., GADRI, A. Electrochemical treatment of aqueous wastes containing pyrogallol by BDD-anodic oxidation. *Journal of Environmental Management* 90 (2009) 523-530

BICHON, E., RICHARD, E., LE BIZECA, B. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1201 (2008) 91–99

BOBÉ, A., COOPER, J., COSTE, C., MULLER, M. Behaviour of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. *Pestic Sci* 52 (1998) 275-281.

CARDOZO, A., CUELLAR, S., ROSERO M, AGUIRRE M. Optimización del flujo según la curva de VAN DEEMTER y validación de la técnica TÉCNICA HS-SPME GC- μ ECD para la determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano. Investigación en curso, Semillero SIMTA Universidad de Caldas. Departamento de Química Universidad del Quindío (2009)

CASAS, J., GARCIA, J., GUADAYOL, J., OLIVE, J. Análisis Instrumental 2: Cromatografía y electroforesis. Ediciones UPC, Barcelona 1994 p.p. 254.

CASTILLO, J. Aplicación del método del estándar interno a la Cromatografía de Gases. Agosto 2003. p.p 2 -3

CONNELLY, P., Environmental fate of fipronil: California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation (2002) p.p 1 – 2

DAVRIO, M., BLANCH, G., CIFUENTES, A., DIEZ, J., DE FRUTOS, M., HERRAIZ, M., MARTINEZ, I., SANZ, J. Cromatografía y electroforesis en columna. Edición 1ª. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona. (2000) 345, 347

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J., GENECQUE, E., LEMENACH, K., BUDZINSKI, H., CLUZZEA, U., PHAMDELÉGUE, M. Comparative sublethal toxicity of nine

pesticides on olfactory learning performances of the honeybee. *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* 48 (2005) 242-250.

EFTAXIAS, A., FONT, J. FORTUNY, A., FABREGAT, A., STUBER, F. Catalytic wet air oxidation of phenol over active carbon catalyst Global kinetic modelling using simulated annealing. *Applied Catalysis B: Environmental* 67 (2006) 12–23

GALEANO, L., MORENO, S., MOLINA, R., MORALES, A., Separación y cuantificación por CLAR, de los principales productos en la oxidación catalítica del fenol. Centro de Catálisis Heterogénea. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, (2002), p. 1

GARCIA, F., SANTOS, A., Oxidación catalítica de compuestos fenólicos en aguas residuales. Dpto. de Ingeniería Química. Facultad de CC. Químicas. Universidad Complutense de Madrid. (1999), p. 269

JIMENEZ, J., BERNAL, M., NOZAL, M., MARTIN, T., MAYO, R. Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 40–45.

LAI, C., LI, P., YU, H., WAN, J., KAN, K., WANG, Y. A rapid HPLC–ESI-MS/MS for qualitative and quantitative analysis of saponins in “XUESETONG” injection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2006) 669–678

MAJA., A., HRVOJE, K., NATALIJA, K., DANUTA, L., LONČARIĆ, A. Heterogeneous Fenton type processes for the degradation of organic dye pollutant in water — The application of zeolite assisted AOPs. *Desalination* (2010) en proceso

MALISH. L. Determination of residues chemotherapeutics and antiparasitic drugs in foods stuffs of anomaly origin with HPLC and UV-Vis diode array detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13 (1999) 2801 – 2827

MATTA, R., HANNAA, K., CHIRON, S. Oxidation of phenol by green rust and hydrogen peroxide at neutral pH. *Separation and Purification Technology* 61 (2008) 442–446

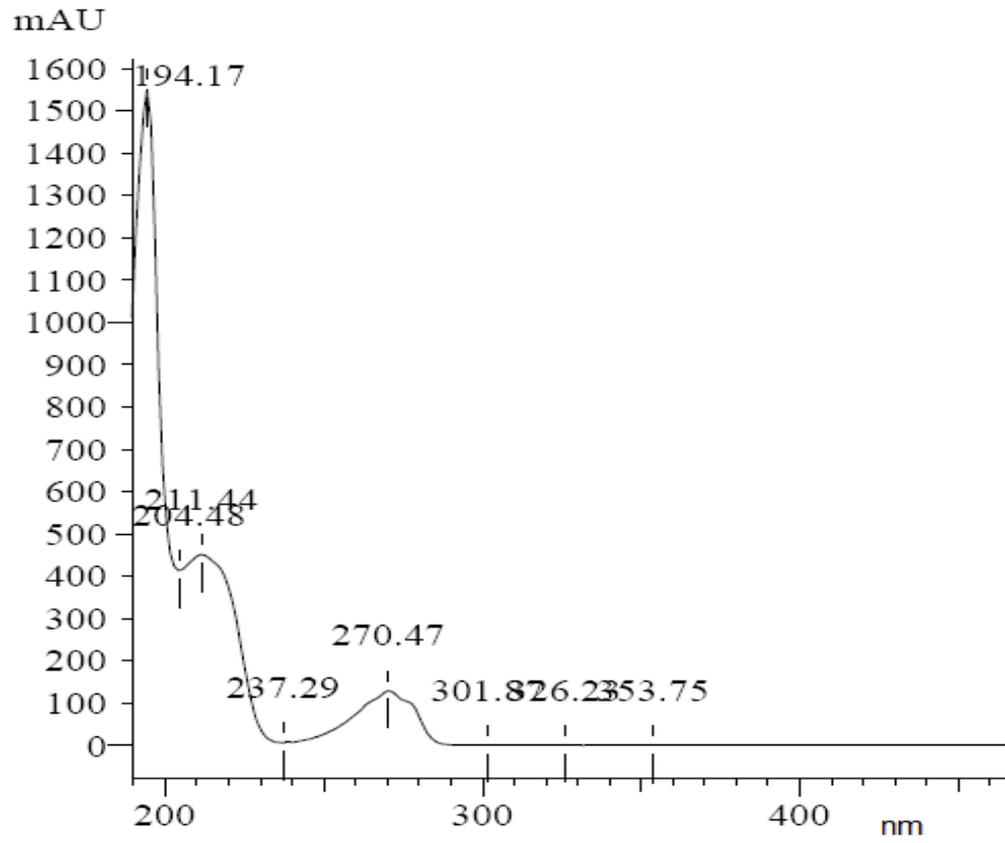
MOHAMMAD, R., SEYED, M., KAMYAR, K. Determination of Fipronil Residue in Soil and Water in the Rice Fields in North of Iran by RP-HPLC Method. *Acta Chim. Slov.* 53 (2006) 517–520

MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J Chromatogr A* 982 (2002) 267-273.

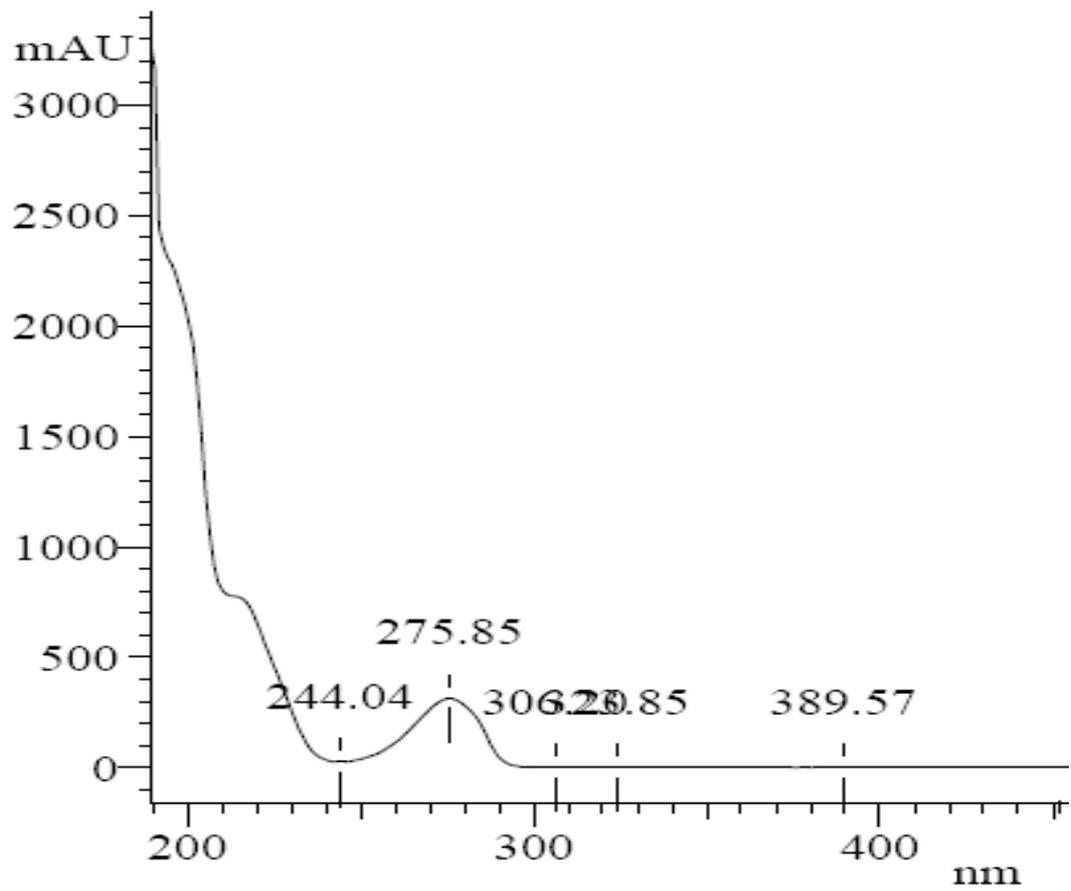
- PAWLISZY, J., Solid phase microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, 1997. p.p. 21
- PEI, Z., YITONG, L., BAOFENG, L., GAN, J Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. *Chemosphere* 57(2004) 1691-1696.
- PELLIZZARI, E. "Electron capture detection in gas chromatography" *J Chromatogr A*, 98(2) (1998) 323–361.
- RAMESH, A., BALASUBRAMANIAN, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, fipronil and trifluralin in aqueous buffer solutions. *J Agric Food Chem* 47 (1999) 3367- 3371.
- ROHONE-POULENC. Fipronil: research triangle park, N. C., World Wide Technica Bulletin p.p. 21
- SÁNCHEZ, C., MIGUEL, E., TADEO, J. Determination of fipronil in honey and pollen samples by gas chromatography. Proc 11as *Journal de Instrumental Análisis*. Barcelona. 17.(2005) 122 pp.
- SKOOG, D. LEARY, J. Análisis instrumental. 4ª edición. Madrid: Mc Graw Hill, 1995, p.p. 675, 731
- TOMLIN, C. The Pesticide Manual: A World Compendium, 10th ed, British Crop Protection Council, *Croydon*, 1994. p.p. 253
- VILCHEZ, J., PRIETO, J., ARAUJO, L., NAVALO, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 919 (2001) 215–221
- WALORCZYK, S., Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 202–214
- WENJIAN, L., TSUKADA, D., GREENSTEIN, L., BAY, S., MARUYA S. Analysis, occurrence, and toxic potential of pyrethroids and fipronil in sediments from the Ballona Creek estuary. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, (2009) 277-289.

ANEXOS

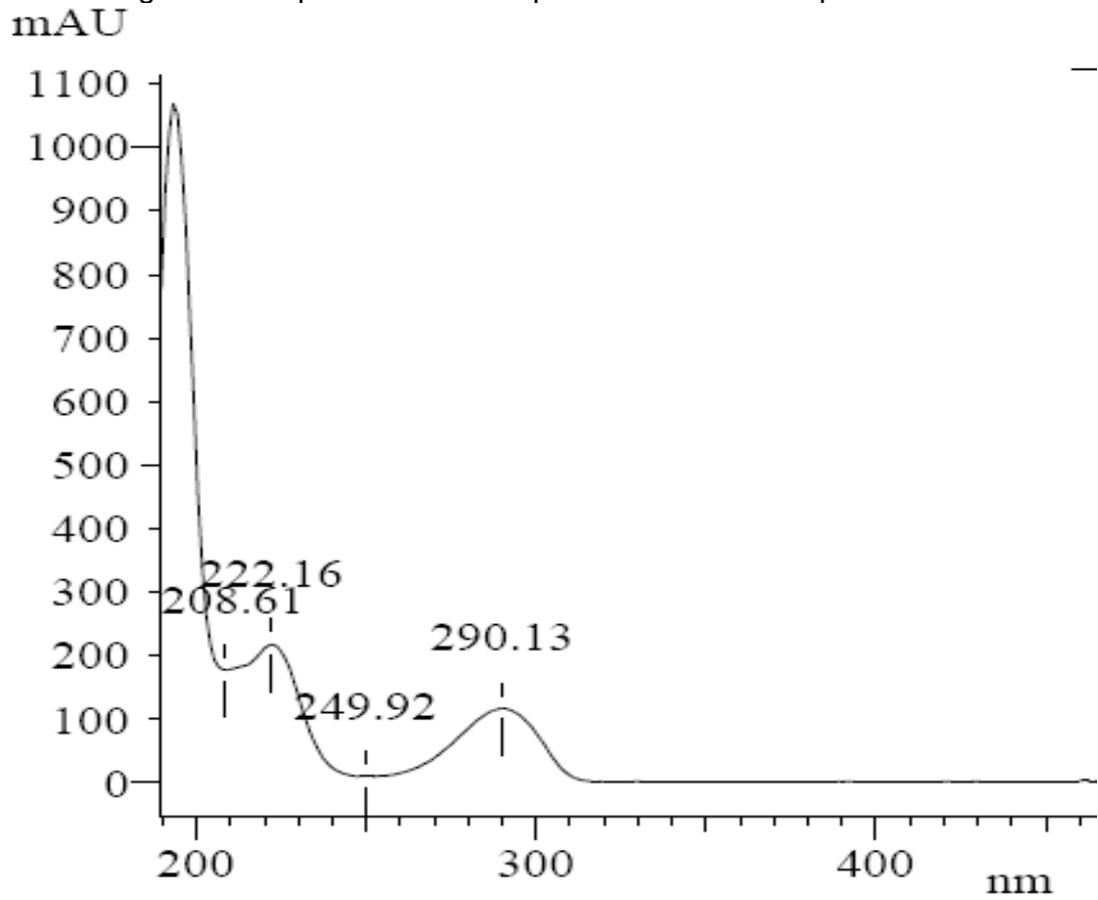
Anexo A. Figura 19. Espectro UV correspondiente al fenol.



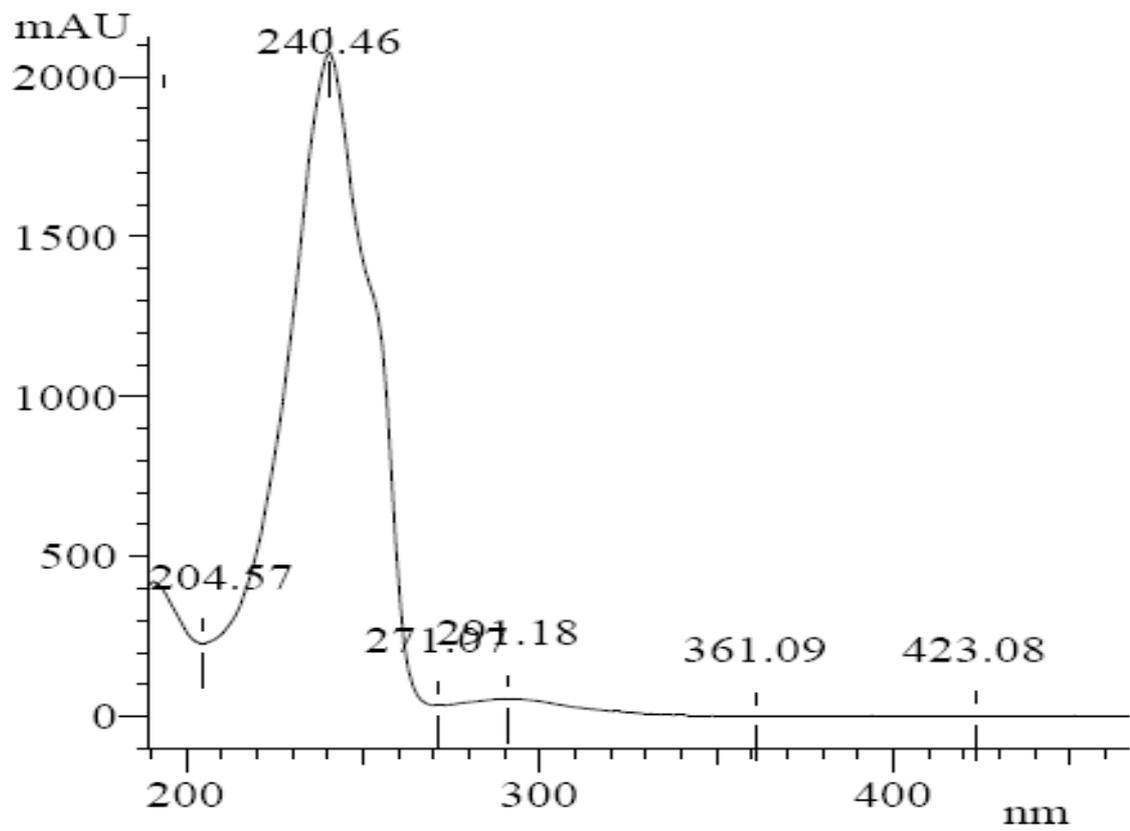
Anexo B. Figura 20. Espectro UV correspondiente al catecol.



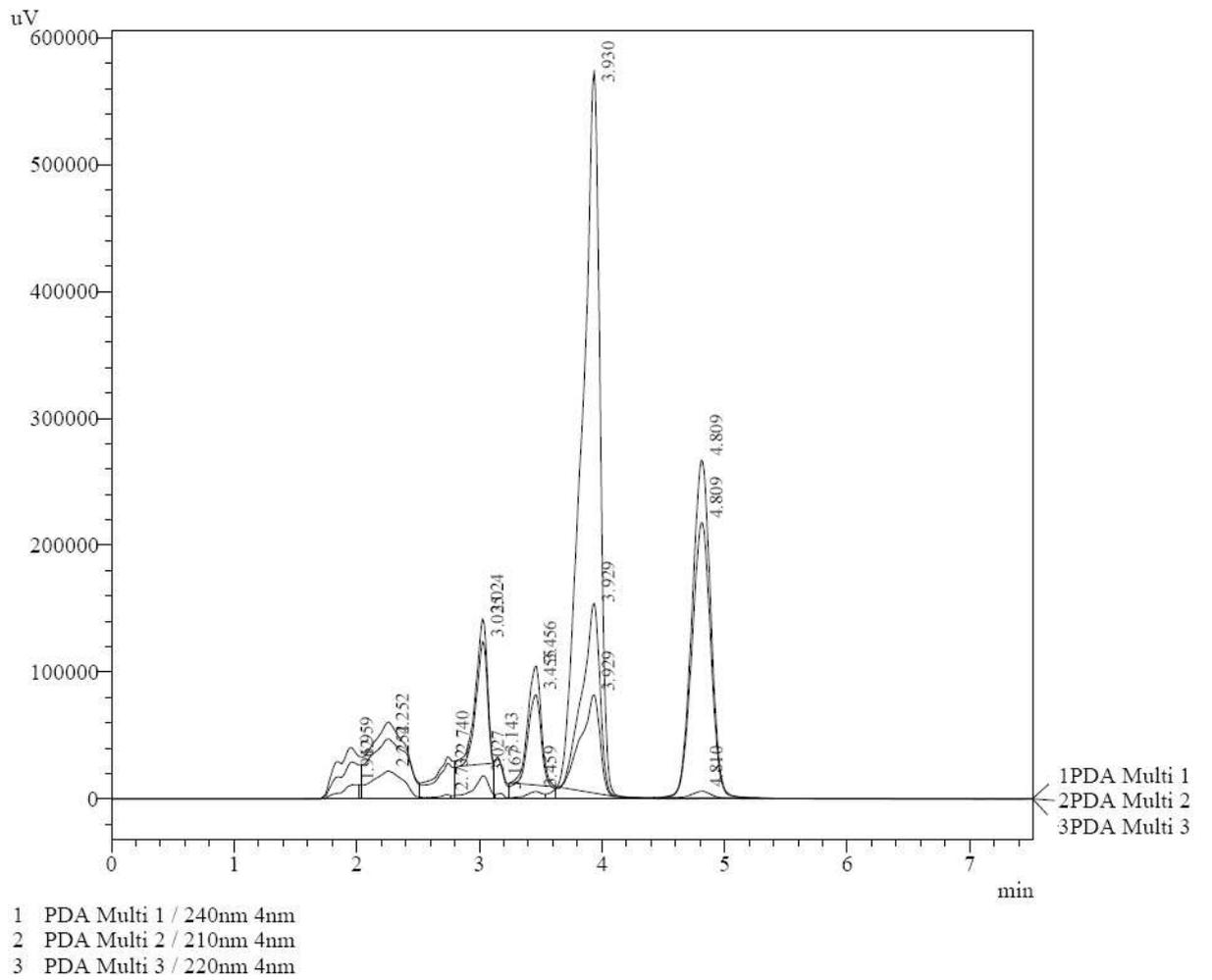
Anexo C. Figura 21. Espectro UV correspondiente a la hidroquinona.



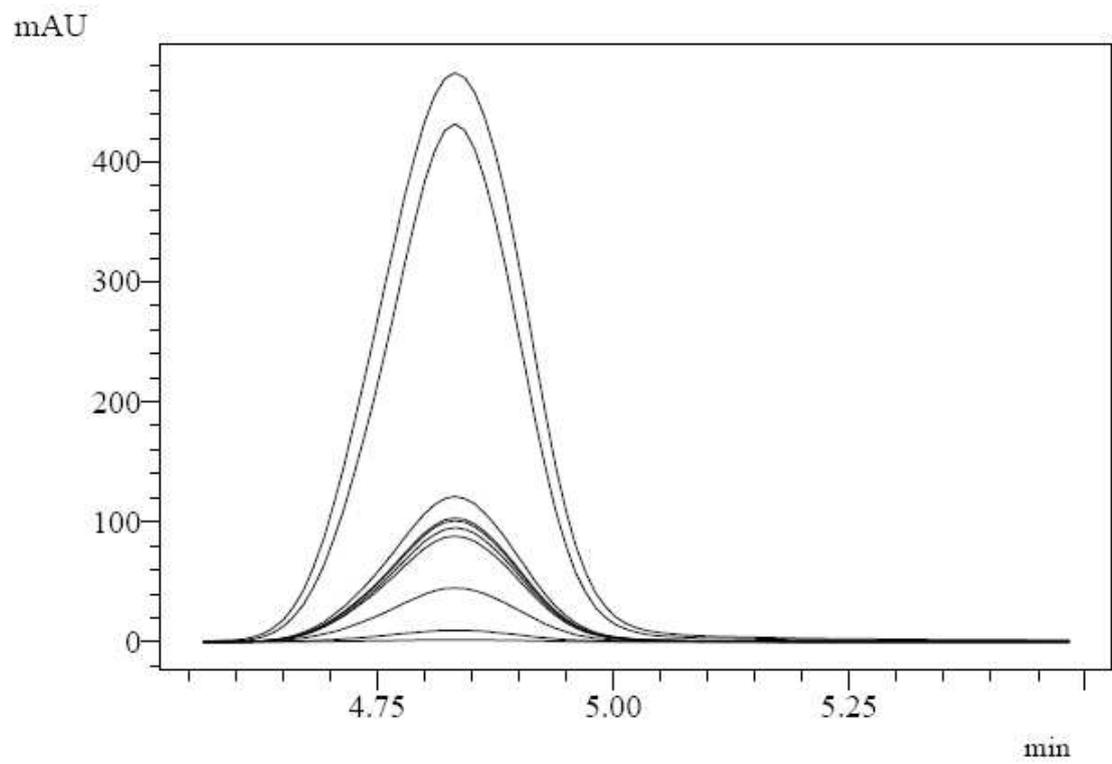
Anexo D. Figura 22. Espectro UV correspondiente a la benzoquinona.



Anexo E. Figura 23. Barrido de las tres longitudes de onda



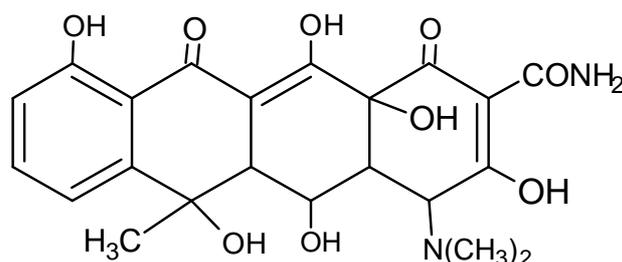
Anexo F. Figura 24. Perfil cromatográfico.



Técnicas estandarizadas en cromatografía líquida de alta eficiencia.

Determinación de residuos de tetraciclinas en carne, para esta técnica se utilizó una ampollita de oxitetraciclina de una concentración de 5mg/mL, la estructura de este compuesto se muestra en el esquema 6.

Anexo G. Esquema 6. Estructura de la oxitetraciclina.



A esta sustancia se le realizó el proceso de preparación de la muestra estandarizado por Farrington et al.⁴⁰ Las condiciones cromatográficas se describen en la tabla 20.

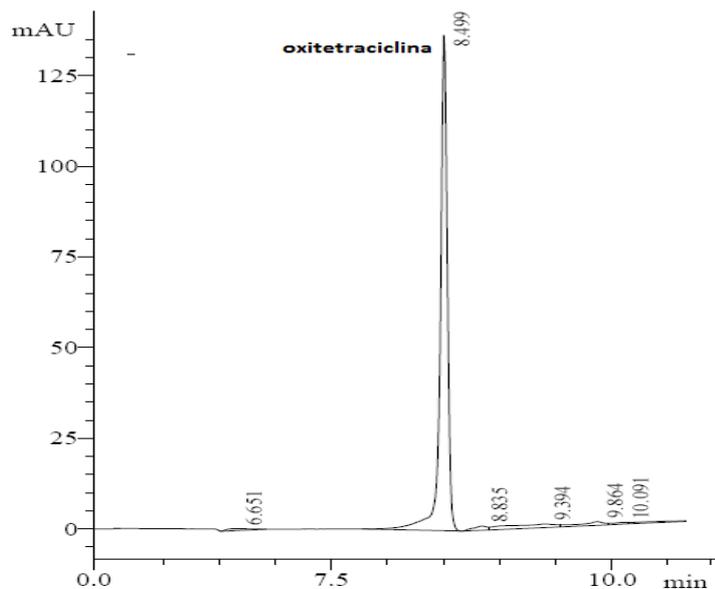
Anexo H. Tabla 20. Condiciones cromatográficas para la determinación de oxitetraciclina en carne.

Modulo	Referencia
Referencia del equipo	Shimadzu equipado con software LC solutions
Automuestreador	Automuestreador y autoinyector
Columna analítica	Columna Waters Spherisorb® 5µ ODS2 (4,6mm x 250mm)
Temperatura de la columna	25°C
Fase móvil	A: acetato de amonio 8mM, B: ACN. Gradiente: inicia en 10% de B hasta 60% de B en 10min. Luego isocrático hasta 15min
Velocidad de flujo	1,0mL/min
Longitud de onda de detección	355nm/20nm
Longitud de onda de referencia	600nm/10nm
Detector	DAD 25°C

⁴⁰MALISH. L. Determination of residues chemotherapeutics and antiparasitic drugs in foods stuffs of anomaly origin with HPLC and UV-Vis diode array detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13 (1999) 2801 – 2827

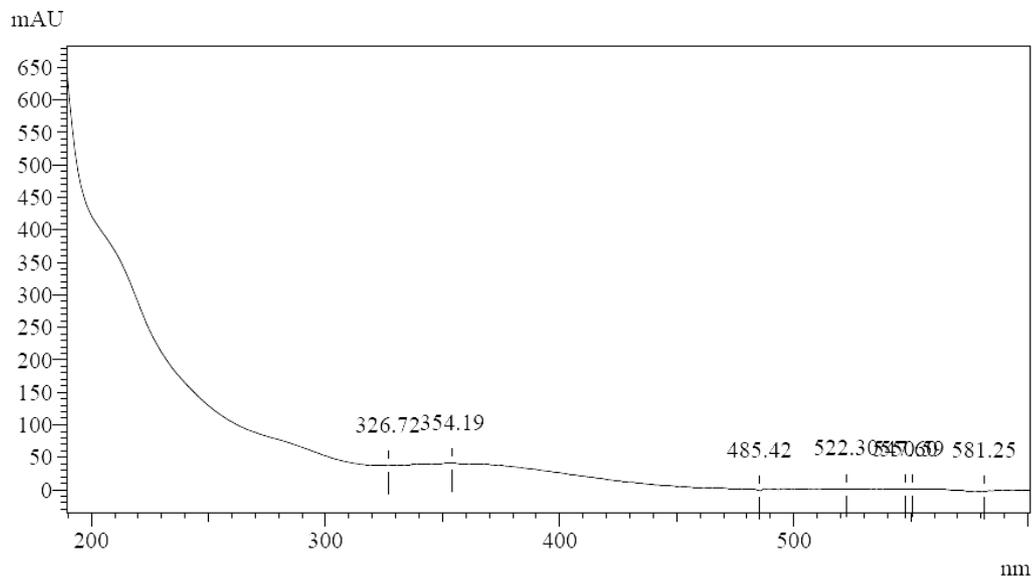
Los preliminarares obtenidos de este trabajo arrojaron resultados sobre el tiempo de retención en el que se espera este compuesto, en la figura 25, se muestra uno de los cromatogramas obtenidos de oxitetraciclina.

Anexo I. Figura 25. Cromatograma de identificación de la oxitetraciclina.



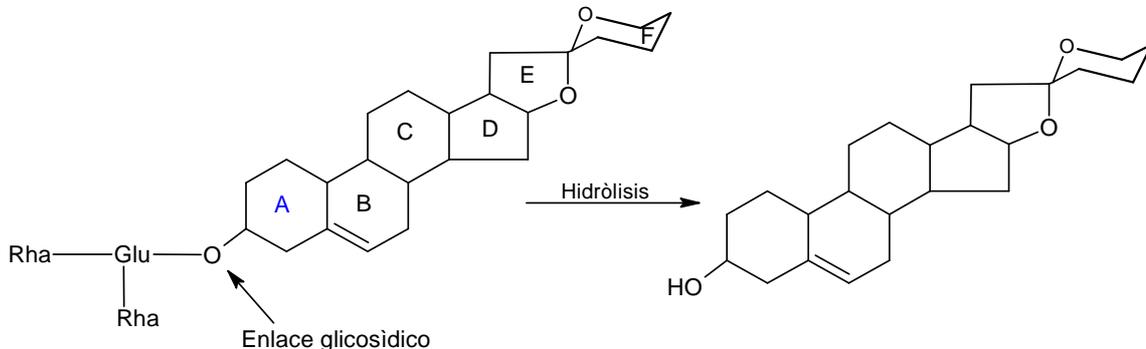
Una de las ventajas del detector DAD es que permite ver el espectro UV de las sustancias separadas en la corrida cromatográfica, en la figura 13 se muestra el espectro de la oxitetraciclina.

Figura 26. Espectro UV de la oxitetraciclina.



Determinación de hecogeninas en jugo de fique. Esta determinación se llevó a cabo bajo las condiciones estandarizadas por Lai et al⁴¹, para la determinación de Saponinas y Sapogeninas, su estructura se muestra en el esquema 7.

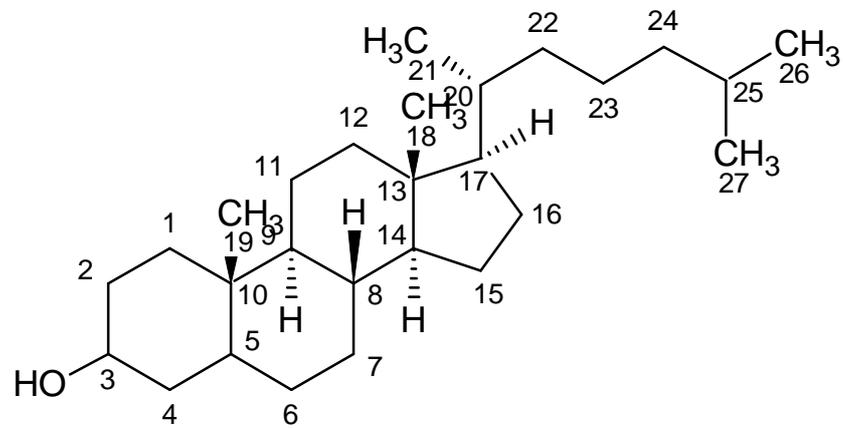
Anexo J. Esquema 7. Estructura de las hecogeninas.



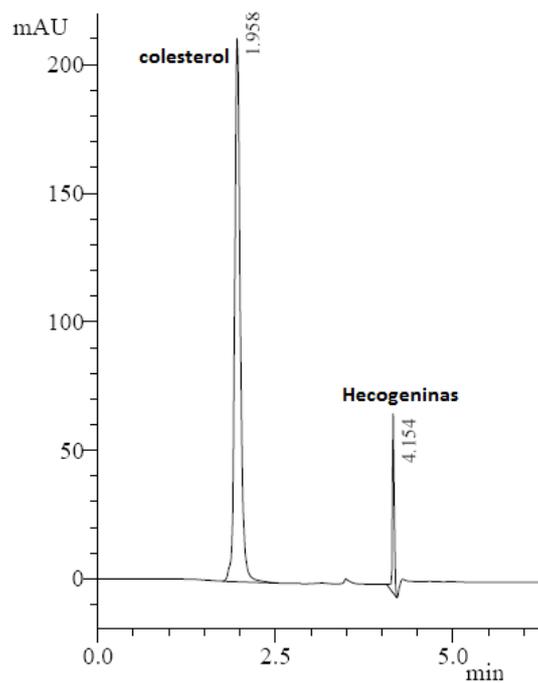
Para realizar un análisis semicuantitativo de estas sustancias se usó colesterol en una concentración de 25ppm dada la similitud en sus estructuras, en el esquema 8 se muestra la estructura de este compuesto, se inyectó esta sustancia con el líquido extraído del jugo de fique en varios tiempos de fermentación. En la figura 14 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos de este procedimiento.

Anexo K. Esquema 8. Estructura del colesterol

⁴¹ C.M. LAI, C., LI, P., YU, H., WAN, J., KAN, K., WANG, Y. A rapid HPLC–ESI-MS/MS for qualitative and quantitative analysis of saponins in “XUESETONG” injection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40 (2006) 669–678

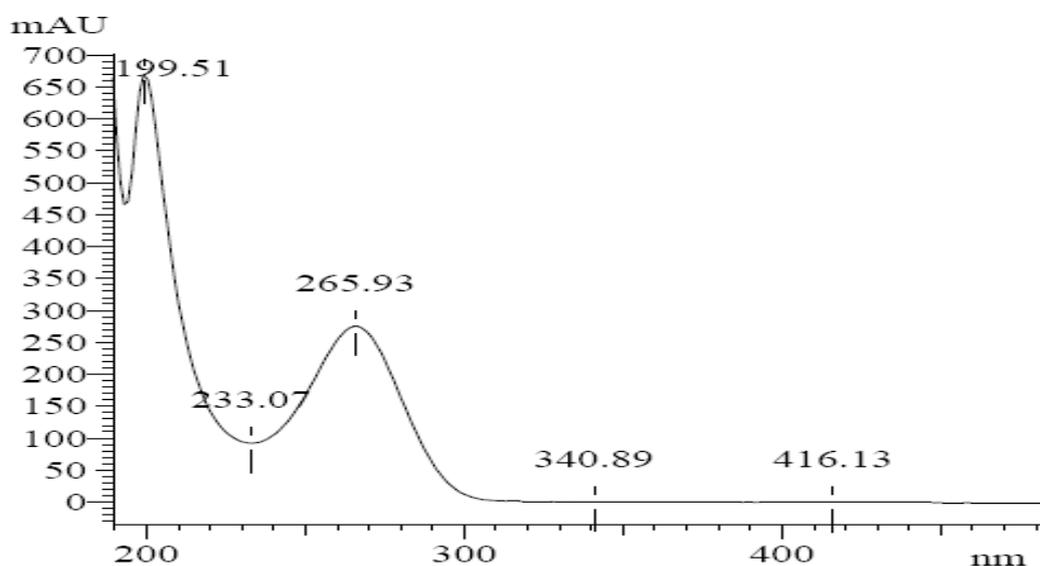


Anexo L. Figura 27. Cromatograma de la determinación semicuantitativa de hecogeninas por estándar interno.



El espectro característico para este tipo de sustancias se presenta en la figura 15.

Anexo M. Figura 28. Espectro UV característico para las hecogeninas aisladas del jugo de fique.



Técnicas estandarizadas en cromatografía de gases.

En este equipo de cromatografía de gases se llevó a cabo el seguimiento de la reacción de acoplamiento C–C tipo Sonogashira⁴² entre fenilacetileno y clorobenceno para la formación de difenilacetileno como se muestra en el esquema 9 con el fin de encontrar las mejores condiciones de reacción, las cuales den los mejores rendimientos de reacción haciendo uso de hidroxisales de zinc como soporte de nanoparticulas de paladio como catalizadores de esta reacción. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las que se describen en la tabla 21.

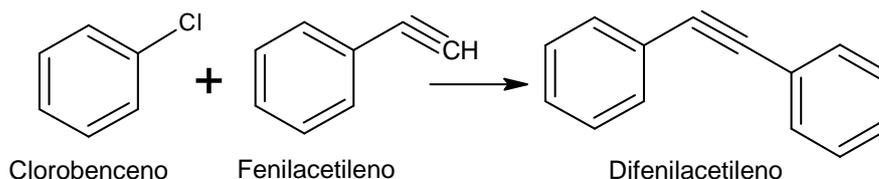
Anexo N. Tabla 21. Condiciones cromatográficas para el seguimiento de la reacción de acoplamiento C–C tipo Sonogashira

Modulo	Referencia
Referencia del equipo	AT 6890
Automuestreador	Inyección manual
Columna analítica	Columna capilar HP-5 con fase estacionaria de 94%metil, 5%fenil, 1%vinilsilicona (30m × 0.25mm i.d. y 0.25µm de espesor de la película) suministrado por Agilent
Programación del horno	Inicia en 50°C (durante 2min), se incrementa hasta 200°C a 20°C/min (durante 2min), y finalmente llevada

⁴² ATHILAKSHMI, J.-, RAMANATHAN S., CHAND D. Facile synthesis of palladium nanoclusters and their catalytic activity in Sonogashira coupling reactions. *Tetrahedron Letters* 49 (2008) 5286–5288

	hasta 300°C a razón de 20°C/min (durante 3min). Post run 320°C 2min
Gas portador	Nitrogeno 99,99%
Velocidad de flujo	0,7mL/min
Inyector	280°C modo splitless
Detector	FID 300°C
Generador de Hidrógeno	Combustible: Hidrógeno 45mL/min Comburente: Aire 450mL/min

Anexo O. Esquema 9. Reacción de acoplamiento entre clorobenceno y fenilacetileno.



La cuantificación del rendimiento de la reacción se hizo mediante el método de estándar interno utilizando hexadecano como estándar interno de calibración se muestran en la tabla 22 y la figura 29 muestra la curva de calibración obtenida.

Anexo P. Tabla 22. Datos curva de calibración del difenilacetileno mediante estándar interno.

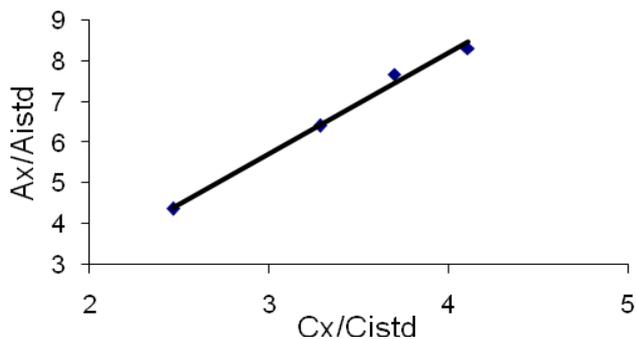
Cx (g/L)	Clstd (g/L)	Ax	Alstd	Cx/Clstd	Ax/Alstd	F
12	4,87	5098,3	1168,48	2,46406571	4,363189785	1,77072785
18	4,87	18476,1	2411,7	3,69609856	7,661027491	2,07273355
16	4,87	12369,5	1930,97	3,28542094	6,405847838	1,94977994
20	4,87	11690,7	1406,8	4,10677618	8,31013648	2,02351823

De esta tabla se puede apreciar que los factores de respuesta obtenidos son similares unos de otros, a partir de estos datos y la pendiente de la grafica se obtuvieron los siguientes datos:

F promedio 1,95418989
F teórico: 2,46835824
S: 0,1323339

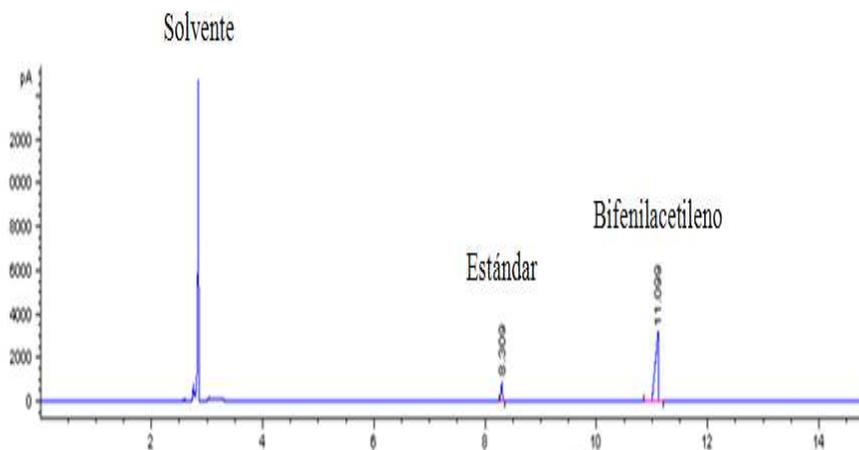
CV: 6,77180359

Figura 29. Curva de calibración del difenilacetileno con hexadecano como estándar interno a la misma concentración.



La figura 30 se muestra un cromatograma del seguimiento de la reacción de acoplamiento entre el fenilacetileno y el clorobenceno.

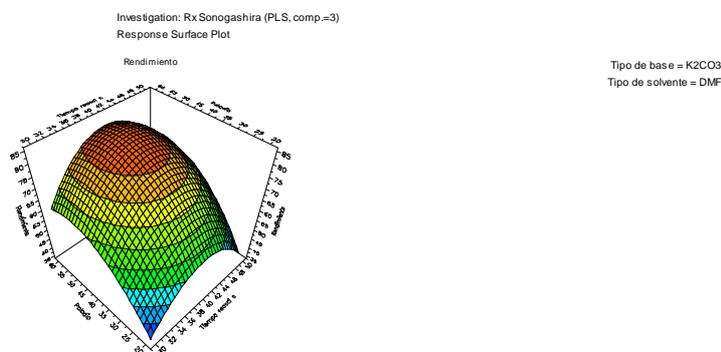
Figura 30 Cromatograma para cuantificación de la formación de difenilacetileno.



Con el método cromatográfico estandarizado se leyó un diseño de experimentos para optimizar la reacción de acoplamiento mediante la metodología de superficies de respuesta usando factores como: tiempo de reacción, tipos de base y de solvente y materiales laminares con diferente cantidad de nanopartículas de Pd.

Las condiciones óptimas obtenidas fueron: 40 horas, K_2CO_3 como base, DMF como solvente y 40 mg de paladio, permitiendo un rendimiento en la reacción del 83% (ver figura 31)

Anexo Q. Figura 31 Gráfico de superficies de respuesta



También se llevó a cabo la estandarización de la determinación de metano en líquido ruminal de vaca, este se realizó bajo las condiciones descritas en la tabla 23.

Anexo R. Tabla 23. Condiciones cromatográficas para la determinación de metano en líquido ruminal de vaca

Modulo	Referencia
Referencia del equipo	AT 68
Automuestreador	Inyección manual
Columna analítica	Columna capilar HP-5 con fase estacionaria de 94%metil, 5%fenil, siloxano (30m x 0.25mm i.d. y 0.25µm de espesor de la película) suministrado por Agilent
Programación del horno	Inicia en 50°C (durante 2min), se incrementa hasta 110°C a 10°C/min (durante 2min), y finalmente llevada hasta 150°C a razón de 20°C/min (durante 1min). Post run 220°C 2min
Gas portador	Nitrogeno 99,99%
Velocidad de flujo	0,7mL/min
Inyector	280°C modo splitless
Detector	FID 300°C
Generador de Hidrógeno	Combustible: Hidrógeno 45mL/min Comburente: Aire 450mL/min

Uno de los cromatogramas obtenidos de este análisis se muestra en la figura 32.

Anexo S. Figura 32. Cromatograma de identificación de metano en líquido ruminal.

FID2 B, (20070925\A\GV000001.D)

Tiempo de retención: 1,859min

