

15.
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN METODO FIA (ANALISIS POR
INYECCION EN FLUJO) PARA LA DETERMINACION
DE FENOLES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ERIKA GALVEZ MENDOZA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: Prof. M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruíz
Vocal: Prof. Q. Adolfo García Osuna
Secretario: Prof. M. en C. Lucía Cornejo Barrera
1er. suplente: Prof. Q. Lucía Hernández Garciadiego
2do. suplente: Prof. Q.F.B. María Victoria Coutiño Cocarrubias

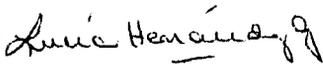
Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Espectrometría de Masas. Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Edificio B. Facultad de Química. UNAM.

Asesor:


Prof. M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruíz

Supervisor Técnico:


Prof. Q. Lucía Hernández Garciadiego

Sustentante:


Erika Gálvez Mendoza

Agradecimientos

A Dios por ser una compañía constante en mi vida.

A mis papas por haber hecho de mi lo que soy con amor y con cariño.

A mi querido hermano José Francisco por su cariño, apoyo, compañía e incondicional amistad.

A mi futuro esposo Luis Alberto, gracias por tu amor, tu ayuda, tu paciencia, tu comprensión y por ser una de las fuerzas que me impulsa siempre.

A Mariana por ser mi más querida amiga, gracias por la gran amistad y cariño que a lo largo de estos años siempre me has demostrado; este logro es de las dos.

A la familia Herrera Valencia por haberme hecho sentir siempre como una parte más de ustedes.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera de Química en Alimentos generación 91-95.

A todos los maestros que me ayudaron en el transcurso de mi carrera en especial a todo el personal del Laboratorio de Espectrometría de Masas: a Humberto, Silvia, Adolfo, Giny y Lucía por su apoyo y paciencia.

ÍNDICE

	página
1. Introducción	5
2. Objetivos	7
3. Antecedentes	8
3.1 Fenoles	8
3.1.1 Historia	8
3.1.2 Estructura Química	9
3.1.3 Propiedades Químicas	10
3.1.4 Comportamiento ácido-base del fenol	10
3.1.5 Reacciones	14
3.1.5.1 Formación de sales de diazonio	15
3.1.5.2 Reacciones de copulación	22
3.1.6 Toxicología	27
3.2 Técnicas FIA (Análisis por Inyección en Flujo)	33
3.2.1 Automatización	33
3.2.2 Técnicas en flujo continuo	33
3.2.3 Generalidades de las técnicas FIA	36
3.2.4 Señales FIA	41
3.2.5 Dispersión	44
3.2.5.1 Coeficiente de difusión	45
3.2.5.2 Influencia de varios factores en la dispersión	46
3.2.6 Características y Ventajas de los sistemas FIA	52
3.3 Métodos de determinación de fenoles	56
3.3.1 Metodologías FIA desarrolladas para la determinación de fenoles	62
4. Desarrollo Experimental y Resultados	67

4.1 Reacción de Cuantificación	67
4.2 Desarrollo de la Metodología FIA	68
4.3 Optimización de la configuración FIA desarrollada	71
4.3.1. Resultados	72
4.3.1.1 Concentración de reactivos	72
4.3.1.2 Flujo	74
4.3.1.3 Volumen de muestra	76
4.3.1.4 Longitud de reactores	76
4.3.1.5 Temperatura	77
4.3.2. Discusión de resultados	79
4.4 Determinación del fenol	81
4.5 Determinación con varios fenoles sustituidos	83
4.6 Discusión de Resultados	123
4.6.1. Clorofenoles	123
4.6.2. Nitrofenoles	125
4.6.3. Aminofenol	126
4.6.4. Fluorofenol	128
5. Conclusiones	134
6. Bibliografía	136

1. INTRODUCCIÓN

Los fenoles son derivados del anillo bencénico con grupos hidroxilo unidos al anillo aromático. Existe un interés creciente en su determinación y cuantificación ya que varios de estos compuestos, los cuales están considerados como contaminantes ambientales por la EPA (Agencia de Protección Ambiental, por sus siglas en inglés), han sido clasificados como cancerígenos.

Estos compuestos se pueden encontrar en el ambiente debido a tres causas principales: 1. Como producto de la degradación de varios pesticidas organofosforados. 2. Como indicio de contaminación realizada por el hombre cuando se encuentran en concentraciones elevadas en aguas potables, municipales y naturales así como en efluentes provenientes de diversas plantas industriales como la del acero, petróleo y las dedicadas a la fabricación de compuestos orgánicos (1), además de que muchos aceites provenientes del cracking del petróleo contienen fenol. y 3. Como producto de la degradación natural de las proteínas y de la descomposición térmica de la madera (2). Algunos compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal de manera natural, particularmente los que no están considerados como contaminantes.

Los métodos de análisis de fenoles más utilizados involucran el uso de técnicas colorimétricas y de técnicas instrumentales como la Cromatografía de Gases y las Espectrometría de Masas.

Aunque existen varios trabajos donde se exponen metodologías automatizadas para la determinación de fenoles, los métodos donde se utiliza la técnica FIA (Análisis por Inyección en Flujo, por sus siglas en inglés) no son reconocidos oficialmente en México. La principal razón para ésto es que esta técnica no es muy conocida en nuestro país, aunque en otros países se utiliza ampliamente para llevar a cabo análisis rutinarios. Esta técnica ofrece un gran número de ventajas sobre las técnicas utilizadas comúnmente para el análisis de fenoles entre las que se puede mencionar la notoria disminución de costos y la facilidad para analizar un mayor número de muestras por unidad de tiempo.

Debido a lo anterior, se propuso un método por inyección en flujo para la determinación de fenol en agua, en el que se involucra la reacción de copulación con sulfanilamida diazotizada, reacción que ha sido ampliamente utilizada y estudiada por ser característica para el fenol.

2. OBJETIVOS

- Realizar una investigación bibliográfica de los métodos comúnmente utilizados para el análisis de fenoles en agua.
- Proponer un método automatizado viable para la cuantificación de fenoles en agua y evaluar las ventajas y desventajas que ofrecen estas técnicas en relación con las que comúnmente se utilizan para estos análisis.
- Optimizar las variables que afectan la metodología por inyección en flujo propuesta para la determinación de fenol.
- Encontrar el intervalo de linealidad para el fenol en el método FIA propuesto.
- Observar las tendencias de linealidad de varios fenoles sustituidos, considerados como contaminantes por la EPA, en el método FIA propuesto y evaluar cómo afecta la presencia de sustituyentes auxocrómicos a la intensidad de la señal analítica.
- Evaluar si es posible introducir el método propuesto como un método de cuantificación de fenoles totales y/o individuales en agua.

3. ANTECEDENTES

3.1 Fenoles

3.1.1 Historia

La historia del fenol se remonta al siglo XIX cuando Runge lo aisló por primera vez, en 1834, a partir del alquitrán de hulla. Los usos iniciales del fenol se limitaron a aplicaciones como conservador de madera y como desinfectante (3).

En 1865 Lord Lister seleccionó al fenol para ponerlo a prueba en el inicio del uso de las técnicas de desinfección. Se utilizaban soluciones fenólicas para limpiar áreas en la piel antes de las cirugías y para desinfectar las compresas con las que se vendaban las heridas.

Una de las primeras preparaciones antisépticas de fenol fue la conocida con el nombre de "liso". Este se obtiene hirviendo una mezcla de aceites pesados de alquitrán con aceites vegetales en presencia de un álcali fuerte, como por ejemplo hidróxido de sodio o potasio (4).

La demanda industrial del fenol no se desarrolló sino hasta principios de este siglo cuando se obtuvo por primera vez la baquelita, la cual fue el primer termoplástico sintético comercial. Se sintetizó en 1906 a partir de la condensación del fenol con formaldehído. El alquitrán de hulla permaneció como la única fuente de fenol hasta la Primera Guerra Mundial, cuando se produjo por primera vez fenol en forma sintética.

La industria moderna del fenol se remonta a los trabajos del Doctor alemán Heinrich Hock quién demostró en 1944 que bajo condiciones apropiadas el cumeno (isopropilbenceno) se puede oxidar a hidroperóxido de cumeno, el

cual, bajo la influencia de un catalizador ácido, se puede descomponer a fenol y acetona.

Hoy en día, la oxidación del cumeno es la ruta más comercial para la producción de fenol a nivel mundial (más del 90% de la demanda mundial de fenol se produce de ésta forma) (3). La síntesis a nivel industrial de varios fenoles sustituidos se realiza a partir de la fusión alcalina de los arenosulfonatos, mientras que la hidrólisis de las sales de diazonio es la técnica más utilizada a nivel de laboratorio (2).

3.1.2 Estructura Química

Los fenoles son compuestos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Debido a que las propiedades químicas del grupo hidroxilo de los fenoles son muy diferentes a las que presenta el mismo grupo en los alcoholes alifáticos, éstos no son considerados como alcoholes. Ambos, tanto los alcoholes como los fenoles, se pueden convertir a ésteres y éteres, aunque en sus demás propiedades, así como en su preparación difieren de tal modo que deben clasificarse en diferentes familias.

Los fenoles generalmente se nombran como derivados del miembro más simple de la familia, el fenol. Se clasifican dependiendo del número de grupos hidroxilo que contenga la molécula en monohídricos, dihidricos, trihidricos, etc.

3.1.3 Propiedades Químicas

Los fenoles más simples son líquidos o sólidos de bajo punto de ebullición. Algunos pueden presentar puntos de ebullición bastante altos debido a que tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno. El fenol es algo soluble en agua (9 g/100 g de H₂O), tal vez debido a esta capacidad, aunque los demás fenoles son esencialmente insolubles en agua. Se oxidan fácilmente siendo coloridos sus productos de oxidación. La sustitución del anillo aromático en los fenoles influye en el punto de ebullición, solubilidad y, por lo tanto, en su volatilidad (5).

3.1.4 Comportamiento ácido-base del fenol

La mayoría de los fenoles tienen pKa's cercanos a 10, por lo que se pueden clasificar como ácidos débiles.

Cuando el fenol se encuentra en una disolución acuosa, se establece el siguiente equilibrio:

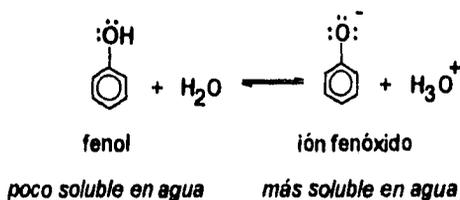
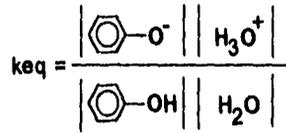


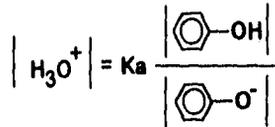
Figura 1. Equilibrio del fenol en disolución acuosa.

En estas condiciones la constante de equilibrio que se establece es la siguiente:



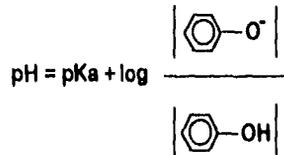
Ecuación 1

A partir de esta ecuación podemos deducir la ecuación de Hendelson:



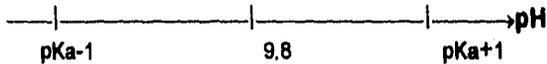
Ecuación 2

o bien:



Ecuación 3

En una escala de pH, el fenol tiene un pKa de 9.8:



De este modo, despejando de la ecuación número 3 la relación entre la concentración entre el ión fenóxido y el fenol se obtiene que en las disoluciones acuosas cuyo pH se encuentre una unidad por debajo del pKa del fenol (9.8),

existirá diez veces más fenol que ión fenóxido, mientras que en las disoluciones que tengan un pH una unidad por encima de 9.8, existirá diez veces más ión fenóxido que fenol.

Si el agua municipal de la Ciudad de México tiene un pH de aproximadamente 7.2, la relación entre el ión fenóxido y el fenol es $10^{-2.6}$; es decir, bajo estas condiciones existe aproximadamente 630 veces más fenol que ión fenóxido. En el caso de otras ciudades en las que el pH de su agua municipal sea diferente a 7.2, esta relación variará dependiendo cuántas unidades de pH se encuentre el agua por encima o por debajo de 9.8.

Realizando un análisis de los pKa se pueden hacer las siguientes afirmaciones:

- Los fenoles son ácidos mucho más débiles que los ácidos carboxílicos, los cuales poseen pKa's alrededor de 5.
- El ácido carbónico posee un pKa de 6.4, por lo que al contrario de los ácidos carboxílicos, los fenoles no se disuelven en soluciones acuosas de NaHCO_3 , ya que no se lleva a cabo la reacción entre el bicarbonato y el fenol.
- La acidez de los fenoles y la solubilidad de sus sales en agua es importante tanto para su análisis como para su separación. Un fenol es, por lo tanto, un compuesto insoluble en agua que se disuelve en soluciones de sosa pero no en soluciones de bicarbonato.
- Un fenol se puede separar de los compuestos no ácidos por su solubilidad en bases y se puede separar de los ácidos carboxílicos por su insolubilidad en NaHCO_3 .
- Los fenoles ($\text{pKa} \approx 10$) son compuestos más ácidos que los alcoholes los cuales muestran propiedades débilmente ácidas sólo frente a bases muy fuertes. Esta diferencia tan notable en acidez se debe a las diferencias en

estabilidad de los reactivos y de los productos cuando ambos compuestos se disuelven en disoluciones acuosas.

Tanto el alcohol como el alcóxido pueden representarse por medio de una sola estructura;

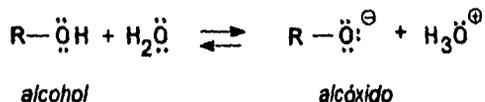


Figura 2. Estructuras resonantes del alcohol y del ión alcóxido.

En cambio el fenol y el fenóxido tienen una estabilización por resonancia en el anillo bencénico lo cual es aumentado por el carácter básico del oxígeno, el cual puede compartir más de un par de electrones con el anillo.

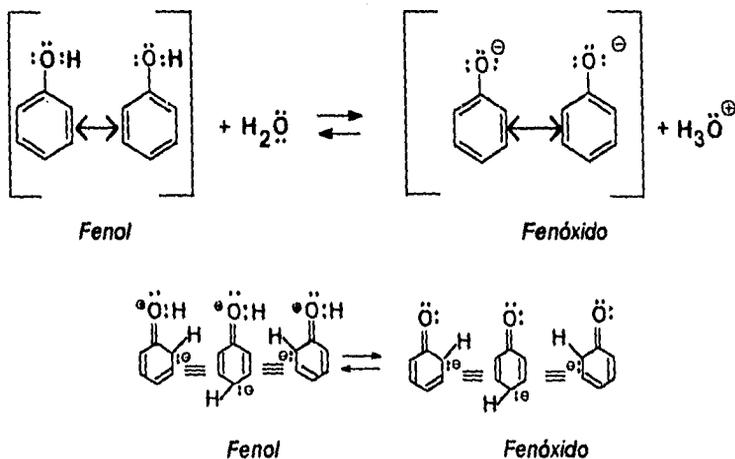


Figura 3. Estructuras resonantes del fenol y del ión fenóxido.

Algunas de las estructuras del fenol son portadoras de una carga positiva y otra negativa, lo cual las hace más energéticas y menos estables; en cambio el ión fenóxido sólo presenta una carga negativa. Por lo tanto, el efecto neto de la resonancia es una mayor estabilización para el ión fenóxido que para el fenol, por lo que se desplaza el equilibrio en el sentido de la ionización.

Los sustituyentes que atraen electrones como -X o NO₂ aumentan la acidez de los fenoles, mientras que los sustituyentes liberadores de electrones como -CH₃, disminuyen la acidez.

Los sustituyentes que atraen electrones tienden a dispersar la carga negativa del fenóxido, mientras que los que liberan electrones la intensifican.

Un grupo liberador de electrones favorece las reacciones en las que el anillo se hace más negativo, como en la conversión de un fenol en su sal (6).

3.1.5 Reacciones

Químicamente, el fenol se caracteriza por la influencia mutua del grupo hidroxilo y del grupo fenilo. El fenol reacciona con las bases para formar sales (llamadas fenóxidos, fenolatos o fenatos). Muchas de estas sales, especialmente las de sodio y potasio, son solubles en agua (2).

El grupo hidroxilo comunica gran reactividad al grupo fenilo. Los átomos de hidrógeno orto y para con respecto al grupo hidroxilo son muy reactivos con numerosos compuestos; la sustitución conduce primero a la formación del derivado 2-mono o 4-mono, luego al derivado 2,4-di, o al derivado 2,6-di y finalmente al derivado 2,4,6 tri, si las condiciones estereoquímicas lo permiten (2).

Una de las reacciones más importantes en la que participan los fenoles y que ha sido ampliamente utilizada para su cuantificación es la de copulación con sales de diazonio para formar compuestos azoicos. A continuación se muestran algunos aspectos generales de estas reacciones.

3.1.5.1 Formación de sales de diazonio

Las aminas aromáticas reaccionan con nitrito de sodio en disoluciones acuosas fuertemente ácidas para formar compuestos solubles conocidos como sales de diazonio (6).

El proceso de formación de las sales de diazonio es llamado diazotización y fué descubierto por P. Griess en 1858 (7).

Estas reacciones consisten en sustituciones electrofílicas en el átomo de nitrógeno. Los términos *diazonium*, *diazo* y *azo* provienen del vocablo francés *azote*, con el cual se denomina al nitrógeno. El término *di* se refiere a dos átomos de nitrógeno unidos en una molécula y unidos a un grupo arilo. Los compuestos que poseen la estructura general, $\text{Ar}-\text{N}=\text{N}-\text{Y}$ donde la Y representa a un átomo diferente al carbono, son llamados *diazo* y aquellos con la estructura general $\text{Ar}-\text{N}=\text{N}-\text{Ar}$ son denominados *azo* compuestos.

Las sales de diazonio sólidas son cristalinas e incoloras aunque se oscurecen en contacto con el aire. Se trata de sustancias inestables que pueden explotar cuando se calientan o al estar sujetas a choques mecánicos, por lo que su elaboración puede ser peligrosa; además de que sus disoluciones se descomponen con producción de nitrógeno cuando se permite que se encuentren a temperatura ambiente. La mayoría de las sales de diazonio son solubles en agua y usualmente se preparan en disoluciones ácidas utilizándose

sin ser aisladas previamente. Si se desean almacenar, se debe realizar bajo condiciones especiales ya que son sensibles a la luz (7).

La velocidad de la diazociación está controlada por la formación de la nitrosamina primaria:



Figura 4. Mecanismo de diazociación.

La nitrosación es una sustitución electrofílica y consiste en la unión de la entidad NO^+ , la cual se puede encontrar en forma libre, o unida a un portador.

Se dice que en soluciones acuosas el agente nitrosante es el trióxido de dinitrógeno, N_2O_3 , (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) aunque esto es poco creíble ya que este compuesto está disociado en estado líquido así como en el estado gaseoso cuando existen trazas de agua presentes. Se puede encontrar este compuesto en disoluciones acuosas, siempre y cuando se disminuya la temperatura drásticamente (-32°C) y se aumente la presión (15).

Estudios cinéticos han demostrado que la velocidad de la reacción se puede volver independiente de la naturaleza y concentración de la amina; y es de segundo orden con respecto al ácido nitroso solamente (6). Supuestamente esto quiere decir que la amina reacciona con el trióxido de dinitrógeno tan rápidamente como éste se forme de modo que la velocidad de la reacción es determinada por la velocidad de descomposición de HNO_2 a N_2O_3 . La estructura del N_2O_3 parece corresponder a una mezcla en equilibrio:

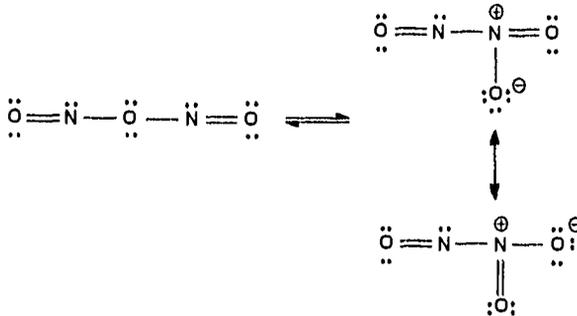
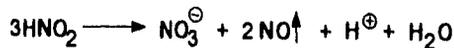


Figura 5. Estructura del trióxido de dinitrógeno.

Una solución de nitrito acidificada con un ácido fuerte contendrá además de HNO₂ y N₂O₃ moléculas de H₂NO₂⁺ y NO⁺. El pKa del sistema H₂NO₂/NO₂ es 3.3 siendo muy poco estable esta especie a pH menores a 5.8 como se muestra a continuación:

En el diagrama simplificado de potencial normal condicional en función del pH para el nitrógeno que se muestra en la figura 6, se puede observar que hasta un pH de 5.8 el HNO₂ o el NO₂⁻ oxidante del sistema N(III)/N(II) tiene un potencial normal superior al HNO₂ o el NO₂⁻ reductor del sistema N(V)/N(III). En medio ácido el HNO₂ no es estable, dismutándose según la reacción:



Debido a lo anterior las especies estables son NO y NO₃⁻ (16). A un pH superior a 5.8 esta situación se invierte siendo el potencial normal del NO₂⁻ reductor superior al del NO₂⁻ oxidante; por lo tanto, la especie estable es NO₂⁻.

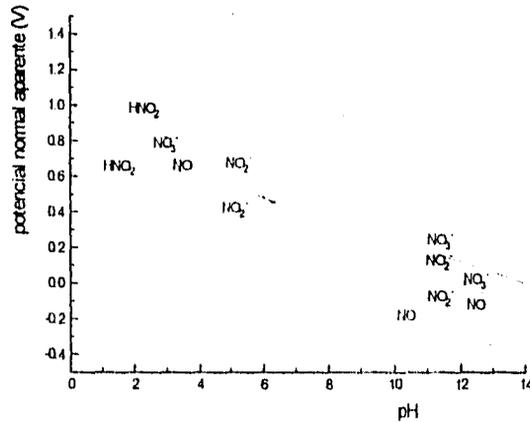


Figura 6. Diagrama de potencial normal condicional en función del pH para el nitrógeno. N(V), N(III) y N(II).

Los sistemas óxido-reductores son:

N(V)/N(III)

Cuando el pH es menor a 3.3 el potencial condicional sigue la siguiente ecuación:

$$E=0.94-0.09pH$$

Cuando el pH es superior a 3.3 el potencial condicional sigue la siguiente ecuación:

$$E=0.838-0.06pH$$

N(III)/N(II)

Cuando el pH es menor a 3.3 el potencial condicional sigue la siguiente ecuación:

$$E=1.00-0.06pH$$

Cuando el pH es superior a 3.3 el potencial condicional sigue la siguiente ecuación:

$$E=1.19-0.12pH$$

N(V)/N(II)

Para toda la escala de pH el potencial condicional sigue la siguiente ecuación:

$$E=0.96-0.08\text{pH} \text{ (16).}$$

Por lo tanto, de acuerdo al diagrama anterior, el agente electrofílico, en disoluciones acuosas con pH ácido debe de ser el NO o el NO₃⁻, aunque esto no se puede asegurar, ya que el objetivo de la presente tesis no era observar quién es el agente nitrosante.

El ión H₃O⁺ ejerce un efecto catalizador en el proceso de diazotización, por lo que en medios ácidos la velocidad de reacción es mayor (8, 11).

Ya que en disoluciones acuosas las sales de diazonio se comportan como electrolitos fuertes y como sales de bases fuertes, deben de ser de naturaleza iónica. Por esta razón se les ha asignado una estructura en la cual un átomo de nitrógeno es tetra-covalente como en las sales de amonio:



Figura 7. Estructura de las sales de diazonio en soluciones.

Siendo Ar un grupo arilo y X el anión del ácido utilizado en la diazotización.

El catión diazonio es mesomérico, siendo las formas canónicas más importantes para el caso del catión benzodiazonio las siguientes:

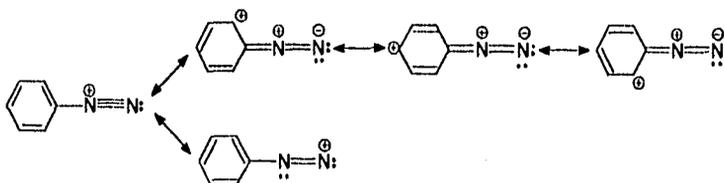


Figura 8. Estructuras canónicas del catión benzodiazonio.

La estructura canónica de la izquierda es la de mayor contribución. Este mesomerismo con su distribución de carga explica la mayor estabilidad presentada por las sales de diazonio aromáticas al compararlas con las alifáticas. La presencia de grupos aceptores de electrones tales como los grupos nitro o los halógeno, especialmente en las posiciones *orto* y *para* aumentan la estabilidad de la sal de diazonio que se forma.

La inestabilidad de las sales de diazonio se explican, al menos en parte por la tendencia del grupo diazonio para separarse como una molécula de nitrógeno, llevándose consigo sus electrones de enlace (7).



Figura 9. Mecanismo de liberación de nitrógeno a partir de sales de diazonio.

Los grupos aceptores de electrones provocan que lo anterior sea más difícil. Algo similar ocurre con los grupos liberadores, los cuales también aumentan la estabilidad de las sales de diazonio cuando se encuentran en la posición *para*. Se ha sugerido que esto se logra mediante un mecanismo por medio del cual se reduce la carga positiva neta en el grupo N_2^+ aumentando el carácter de doble enlace del enlace carbono-nitrógeno.



Figura 10. Estructuras canónicas del catión *p*-metoxi-bencendiazonio.

Se dificulta por lo tanto la heterólisis de este enlace. La naturaleza del anión también tiene influencia en la estabilidad de las sales de diazonio, siendo más estables las de ciertos ácidos sulfónicos aromáticos que las correspondientes de ácidos minerales (7).

Las reacciones de las sales de diazonio se han dividido en dos grupos: aquellas en las cuales el reemplazo del grupo diazonio ocurre con la liberación de nitrógeno, y aquellas en las cuales se retienen los dos átomos de nitrógeno (7).

Dentro de la primer categoría se encuentra la reacción de reemplazo por hidroxilo por medio de la cual se obtiene como producto un fenol al someter a calentamiento una solución acuosa de la sal de diazonio (5):



Figura 11. Reacción de producción de fenol a partir de una sal de diazonio.

El mecanismo de reacción es el siguiente:

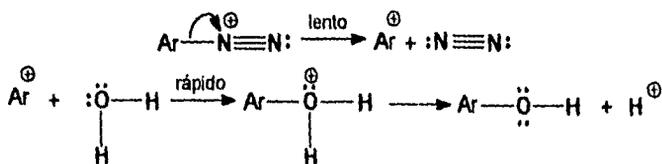


Figura 12. Mecanismo de la reacción de producción de fenol a partir de una sal de diazonio.

y dentro de la segunda categoría se encuentran las reacciones de copulación, en las cuales se hará incapie debido a su importancia en el presente trabajo.

3.1.5.2 Reacciones de Copulación

Las sales de diazonio reaccionan rápidamente con aminas arílicas y con fenoles bajo condiciones apropiadas en las llamadas reacciones de copulación, dando como productos a compuestos coloridos denominados azo-compuestos (7).

Las reacciones de copulación siguen un mecanismo de sustitución electrofílica aromática. En estas reacciones el anillo bencénico sirve como una fuente de electrones, es decir, como una base. Los compuestos con los cuales reacciona están deficientes de electrones, es decir, son agentes electrofílicos o ácidos (5).

Las reacciones de copulación ocurren en disoluciones ácidas, neutras o levemente alcalinas, siendo éstas últimas las mejores condiciones para que reaccionen los fenoles.

La reacción de copulación es una sustitución del catión diazonio, el cual actúa como agente electrofílico, en un átomo de carbono del anillo bencénico el cual está activado por un grupo hidroxilo o un amino. El catión diazonio es mesomérico y la reacción de copulación se comporta hasta cierto punto como si tuviera la estructura canónica, $\text{Ar}-\ddot{\text{N}}=\text{N}^{\oplus}$, en la cual el átomo de nitrógeno terminal está cargado positivamente y está deficiente de electrones. Como agente electrofílico, sólo es capaz de sustituir en las posiciones del anillo bencénico que están suficientemente activadas, como por ejemplo, aquellas que se encuentran en posición *orto* o *para* con respecto a un grupo amino o hidroxilo. Las reacciones de copulación ocurren más rápidamente en la posición *para* que en la *orto*, de modo que si la posición *para* con respecto a un grupo amino o hidroxilo está libre, se obtiene el derivado *p*-amino o *p*-hidroxi

azobenceno, con una muy pequeña cantidad del isómero *orto*. Sin embargo, si la posición *para* se encuentra bloqueada por otro grupo, la reacción de copulación ocurre sin dificultad en la posición *orto*. Si ambas posiciones, la *para* y la *orto*, están bloqueadas, la reacción de copulación no ocurre, no estando suficientemente activada la posición *meta* para el ataque del catión diazonio. El mecanismo de la reacción de copulación se muestra en la figura 13.

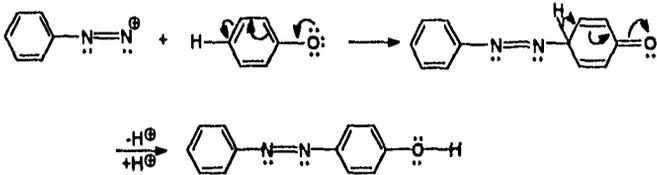


Figura 13. Mecanismo de las reacciones de copulación.

La reacción de copulación con los fenoles se lleva a cabo más fácilmente en soluciones ligeramente alcalinas. El átomo del oxígeno cargado negativamente del anión fenóxido es un activante mucho más poderoso que el grupo hidroxilo neutral. La reacción de copulación se lleva a cabo con el anión fenóxido y no con el fenol sin ionizar. Se debe evitar un gran exceso de álcali ya que en estas condiciones, los cationes diazonio pueden formar compuestos diazo, los cuales pierden su habilidad para copular (7).

Los sustituyentes que liberan electrones del anillo de la sal de diazonio, facilitan la reacción de copulación, haciendo al grupo diazonio más electrofílico, probablemente porque la estructura mesomérica se acerca más a la forma o formas canónicas en la cual el nitrógeno terminal es positivo y deficiente de electrones:

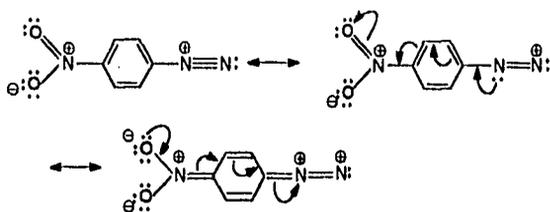


Figura 14. Resonancia del catión p-nitro bencendiazonio

Por lo tanto, tales grupos aumentan la velocidad de copulación, así como la estabilidad de la solución de sal de diazonio.

Un grupo donador de electrones adicional al amino o al hidroxilo en el anillo bencénico facilita el proceso de copulación especialmente los grupos amino, hidroxilo o amino alquilado. Tales grupos son más efectivos cuando se encuentran en la posición *meta* con respecto al grupo hidroxilo o dialquil amino original, ya que en esta posición pueden reforzar más el efecto activante del otro grupo amino o hidroxilo. Por lo tanto, el resorcinol (*m*-dihidroxibenceno) copula más rápidamente que el fenol con una solución de sal de diazonio dada, siendo en *para* la posición de la copulación a un grupo hidroxilo y *orto* con respecto al otro (5).

Cuando el resorcinol es tratado con un exceso de sal de diazonio, la copulación prosigue fácilmente para dar como productos primero un bi- y luego un tri-azo compuesto.

El fenol también forma derivados bi- y tri-azo con un exceso de sal de diazonio aunque no tan fácilmente como lo hace el resorcinol (17).

Cualquier grupo unido al anillo bencénico afecta su reactividad así como la orientación de la sustitución. Cuando un agente electrofílico ataca un anillo aromático, el grupo que ya está unido al anillo es el que determina que tan fácilmente ocurre el ataque y donde se lleva a cabo.

Un grupo cuyo efecto es hacer al anillo más reactivo que el benceno recibe el nombre de grupo **activante**; mientras que un grupo que hace que el anillo sea menos reactivo recibe el nombre de grupo **desactivante**.

Un grupo que hace que el ataque ocurra principalmente en las posiciones **orto** y **para** con respecto a sí, recibe el nombre de **director orto-para**. Un grupo que hace que el ataque ocurra principalmente en la posición **meta** con respecto a sí recibe el nombre de **director meta**.

Casi todos los grupos sustituyentes caen dentro de dos categorías: activantes y directores **orto-para**, y desactivantes y directores **meta**. Los halógenos forman una clase aparte por sí mismos siendo desactivantes pero directores **orto-para** (5).

Tabla 1. Efecto de los grupos en la sustitución electrofílica aromática.

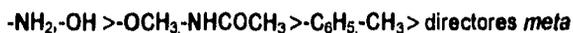
Activantes: directores orto-para	Desactivantes: directores meta
Fuertemente activantes	-NO ₂
-NH ₂ (-NHR, -NR ₂)	-N(CH ₃) ₃ ⁺
-OH	-CN
Moderadamente activantes	-COOH (-COOR)
-OCH ₃ (-OC ₂ H ₅ , etc.)	-SO ₃ H
-NHCOCH ₃	-CHO, -COR
Debilmente activantes	Desactivantes: directores orto-para
-C ₆ H ₅	-F, -Cl, -Br, -I
-CH ₃ (-C ₂ H ₅ , etc.)	

Quando se presentan dos sustituyentes en el mismo anillo bencénico se pueden presentar dos situaciones:

Los dos sustituyentes se localizan de manera tal que la fuerza directiva de uno refuerce la del otro.

La fuerza directiva de un grupo se opone a la del otro. En estas situaciones se obtienen mezclas complejas de diversos productos. Sin embargo, cuando las fuerzas directoras se oponen, es posible hacer ciertas generalizaciones:

(a) Los grupos activantes fuertes predominan sobre grupos desactivantes o activantes débiles. La secuencia que se ha observado en el poder directivo es la siguiente.



Sin embargo, la diferencia en el efecto de los dos grupos debe ser bastante notoria para obtener resultados claros, ya que de lo contrario se pueden obtener mezclas de isómeros.

(b) Existe muy poca sustitución entre dos grupos que se encuentran en posición *meta* respecto al otro. En muchos casos al parecer no existe suficiente espacio entre los dos grupos localizados en posición *meta* con respecto al otro para que exista una sustitución notable en esa posición.

La reactividad en la sustitución electrofílica aromática depende en la tendencia del grupo sustituyente a liberar o atraer electrones. Un grupo que dona electrones activa el anillo mientras que un grupo que acepta electrones desactiva el anillo (5).

3.1.6 Toxicología

Los fenoles presentan una mayor toxicidad en comparación con muchas otras clases de compuestos orgánicos. La mayoría de los alquil fenoles, clorofenoles y nitrofenoles exhiben un alto grado de toxicidad aunque siguen rutas metabólicas diferentes (18).

El fenol altera y precipita las proteínas celulares y en pequeñas cantidades tiene un efecto estimulante sobre el centro respiratorio lo que provoca alcalosis respiratoria seguida de acidosis. También puede ocurrir metahemoglobinemia. Los triclorofenoles pueden ser carcinógenos.

Los hallazgos patológicos en muertes producidas por fenol o compuestos relacionados son necrosis de las mucosas, edema cerebral, y cambios degenerativos hepáticos y renales. Puede haber también necrosis vesical (20).

Datos clínicos

Las principales manifestaciones de envenenamiento con los fenoles considerados como contaminantes son vómito, colapso y coma.

A. Envenenamiento agudo (por ingestión o aplicación sobre la piel o sobre las mucosas): Los hallazgos locales son decoloración indolora o eritema. Puede haber corrosión. Los hallazgos generales son gran aumento en la transpiración, sed intensa, náusea, vómito, diarrea, cianosis por la metahemoglobinemia, hiperactividad, estupor, caída de la presión arterial, dolor abdominal, hemólisis, convulsiones, coma y edema pulmonar seguido por neumonía. Si la muerte producida por insuficiencia respiratoria no es inmediata, pueden ocurrir ictericia y oliguria o anuria.

B. Envenenamiento crónico (por ingestión o adsorción a través de la piel o las mucosas): El uso repetido puede causar los síntomas descritos para el

envenenamiento agudo. Ocasionalmente ocurren reacciones cutáneas por sensibilidad (20).

a) FENOL

La ingestión oral de fenol en el hombre es considerablemente menos tóxica que la adsorción a través de heridas, cavidades corporales o a través de la piel intacta (21). La corrosión sufrida por el tracto digestivo seguida a la ingestión de fenol es mucho menos agresiva que la producida por ácidos o álcalis fuertes. Algunas ocasiones solo se produce un dolor ligero debido a que el fenol destruye muchas clases de fibras nerviosas, capacidad que se aprovecha algunas veces empleando soluciones de fenol al 6% en glicerina para producir bloqueos nerviosos. Al parecer el fenol no comparte la habilidad de muchos de sus derivados tal como el pentaclorofenol y los nitrofenoles de desacoplar la fosforilación oxidativa (4).

b) AMINOFENOLES

Los tres monoaminofenoles son tóxicos, siendo el isómero *para* el más tóxico y el más estudiado. El isómero *orto* es más potente que el *para* en la generación de metahemoglobina, aunque ésta parece ser de importancia limitada en las reacciones agudas y letales (4).

c) NITROFENOLES

Todos los isómeros son muy tóxicos, siendo el más tóxico el dinitrofenol; este compuesto comparte la mayor parte de las propiedades tóxicas del fenol, además de que estimula las células del cuerpo, desacoplando la fosforilación oxidativa. Actúa interfiriendo en la síntesis intracelular de ésteres fosfato de alta energía. El compuesto más tóxico de los mononitrofenoles es el isómero *para* aunque los tres presentan una sintomatología similar. Se ha comprobado que el isómero *para* es un agente mutagénico en humanos (4). Cuando los nitrofenoles se descomponen por calentamiento, se pueden generar vapores tóxicos de óxidos de nitrógeno (20).

d) FLUOROFENOLES

Estos compuestos son moderadamente tóxicos aunque se ha encontrado que son posibles cancerígenos. Cuando se descomponen por calentamiento, se pueden generar vapores tóxicos de fluor (20).

e) CLOROFENOLES

Existen muchos compuestos isómeros. Los átomos de cloro pueden variar en número de uno hasta cinco. Los monoclorofenoles son ligeramente menos tóxicos que el fenol, aunque tienen mayor capacidad para causar convulsiones. El isómero *orto* es más tóxico que el *meta* y el *para*. Un incremento en el contenido de cloro aumenta la toxicidad, aunque esto, sólo se

manifiesta en los tetracloro y pentaclorofenoles y no en los clorofenoles menores (4). El pentaclorofenol y el 2,4,6 triclorofenol pueden interferir con la fosforilación oxidativa mitocondrial. Cuando estos compuestos se descomponen por calentamiento, se pueden generar vapores tóxicos de cloro (20).

Tabla 2. Comparación de la toxicidad de algunos compuestos fenólicos. (4, 21, 22, 23).

Compuesto	No. CAS ¹	DL ₅₀ ² oral (mg/kg)	Sintomatología
fenol	108-95-2	530	Dstrucción de muchas clases de fibras nerviosas. Provoca lesiones necróticas blancas en la boca, esófago y estómago así como dolor abdominal vómito y diarrea sanguinolenta. Palidez, aumento en la transpiración, debilidad, dolor de cabeza, shock, pulso irregular y débil, respiraciones entrecortadas, cianosis, disminución de la temperatura corporal. Provoca edema pulmonar, pérdida de conciencia y convulsiones, orina escasa y oscura, metahemoglobine-mia e hiperbilirubinemia. Agente mutagénico en humanos, teratogénico ³ experi-mental y posible cancerígeno. Muerte por fallo respiratorio, circulatorio o cardíaco.
o-aminofenol m-aminofenol p-aminofenol	95-55-6 591-27-5 123-30-8	1300 1660 375	Provocan intranquilidad y convulsiones, imitación cutánea y generación de metahemoglobina. Tienen un efecto nefrotóxico y pueden provocar fallo respiratorio y cardíaco.
o-nitrofenol m-nitrofenol p-nitrofenol	88-75-5 554-84-7 100-02-7	2828 447 350	Altamente tóxicos cuando se ingieren, se inhalan o se adsorben a través de la piel. Pueden provocar cianosis y generación de metahemo-globina.
dinitrofenol	25550-58-7	30	Provoca fatiga, sed y transpiración intensas, ruborización de la cara, formación de cataratas y erupciones cutá-neas. Provoca náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea. Causa intranquilidad, ansiedad, excitación y convulsiones. Aumento de la temperatura corporal que puede provocar hiperpirexia grave. Taquicardia, disnea, cianosis y dolores musculares. Orina escasa, hepatitis tóxica y dolores musculares. Pérdida de conciencia y fallo respiratorio. Agente mutagénico y fitotóxico. Efectos teratogénicos.
4-fluorofenol	371-41-5	TDLo ⁴ piel-ratón; 10000	Posible cancerígeno
pentafluorofenol	771-61-9	322 (subcut) ⁵	Envenenamiento por ingestión y por la ruta subcutánea. Moderadamente tóxico por contacto con la piel.

Tabla 3. Comparación de la toxicidad de algunos clorofenoles. (4, 19, 20, 21).

Clorofenol	No. CAS	DL ₅₀ oral (mg/kg)	DL ₅₀ Inpet 6 (mg/kg)	Sintomatología
o-clorofenol m-clorofenol p-clorofenol	95-57-8 108-43-0 106-48-9	670 570 261	230 355 355	Compuestos muy tóxicos cuando se adsorben por la piel, se inhalan o se ingieren. Producen una fuerte irritación en los tejidos y en las mucosas. Son posibles cancerígenos y agentes mutagénicos.
2,4-Diclorofenol 2,6-Diclorofenol	120-83-2 87-65-0	580 2940	281 430	Compuestos de toxicidad moderada. Provocan irritación de tejidos mucosas y ojos. Posibles cancerígenos y teratógenos. Agentes mutagénicos.
2,3,6-Triclorofenol 2,4,5-Triclorofenol 2,4,6 Triclorofenol 3,4,5-Triclorofenol	933-75-5 95-95-4 88-06-2 609-19-8	- 820 820 -	390 308 355 276	Provocan coloración roja y edema en la piel, así como quemaduras químicas. Provocan conjuntivitis, iritis y lesiones en la córnea. Provocan irritación en la nariz y en la faringe. Son posibles cancerígenos y agentes mutagénicos.
2,3,4,6-Tetracloro- fenol	58-90-2	140	130	Posible cancerígeno, teratógeno y agente mutagénico. provoca conjuntivitis y lesiones en la córnea, así como irritación en nariz y faringe. Posible estimulación del metabolismo del O ₂ en los tejidos causando hiperpirexia.
Pentaclorofenol	87-86-5	27	56	Provoca dolor de cabeza, mareos, aumento en la transpiración, náusea, vómito, disnea, dolor de pecho, debilidad, fiebre y convulsiones, así como irritación en ojos, nariz y garganta. Es un posible cancerígeno, teratógeno y agente mutagénico.

Notas:

1. Designación numérica asignada por la Sociedad Americana de Química que identifica de manera única un compuesto químico específico. Este número permite la identificación de un compuesto sin tomar en cuenta el nombre o el sistema de denominación utilizado.
2. Dosis Letal Media. Dosis calculada de cualquier material que se espera que cause muerte a 50% de una población animal experimental definida. Se determina a partir de la exposición de la población al material por cualquier ruta exceptuando la inhalación.
3. Cambios no transmisibles producidos en la descendencia.

4. Dosis Tóxica Baja (TDLo por sus siglas en inglés). Dosis más baja de un material que produce efectos carcinogénicos neoplastigénicos o teratogénicos en animales o humanos. El material es introducido por cualquier ruta (exceptuando la inhalación) en un periodo dado de tiempo.
5. Subcutánea.
6. Intraperitoneal.

La mayoría de los fenoles simples estudiados aquí son posibles cancerígenos a diferencia del 2,4,6 triclorofenol el cual es un cancerígeno confirmado. Es necesario tener muchas precauciones en su manejo, ya que la mayoría también son agentes mutagénicos.

Uno de los compuestos más tóxicos de los anteriormente estudiados es el pentaclorofenol. A pesar de su gran toxicidad, es posible adquirir este compuesto en ferreterías , ya que se utiliza para el control de termitas y en la conservación de madera y sus productos. Debido a los riesgos a la salud que implica el contacto con este compuesto, es necesario condicionar su venta, o en su defecto, es necesario advertir de los riesgos toxicológicos a los compradores.

El dinitrofenol fué un compuesto muy utilizado por las personas que deseaban bajar de peso debido a su capacidad de acelerar el metabolismo. Este uso fué interrumpido debido a su toxicidad.

3.2. Técnica FIA (Análisis por Inyección en Flujo).

3.2.1 Automatización.

La gran demanda actual de análisis en diversos campos, como lo son el clínico, el industrial o el farmacéutico, ha llevado a la necesidad del desarrollo de técnicas que disminuyan el costo y tiempo de los ensayos individuales, que aumenten la precisión y que posean una buena confiabilidad. Todos estos requisitos sólo pueden ser cumplidos por técnicas automatizadas.

Debido a los problemas intrínsecos que representa la automatización de ensayos en lote, se ha optado por automatizar a las operaciones en flujo, ya que en éstas se evita el uso de recipientes que frecuentemente son frágiles, y se utiliza el movimiento secuencial de líquidos a través de tubos.

3.2.2 Técnicas en Flujo Continuo

En estas técnicas la concentración del analito se mide sin detener el flujo de un gas o de un líquido que lo contiene (22).

Las muestras se introducen sucesivamente a intervalos regulares en un canal a través del cual fluye un líquido que contiene al o los reactivos, o de manera alternativa, se pueden introducir los reactivos en etapas posteriores a través de canales auxiliares que se unen al principal. El flujo pasa entonces a la celda de flujo del sistema de detección para después pasar al desecho (22).

Existen dos clases generales de técnicas en flujo continuo: los segmentados y los no segmentados.

Los métodos en flujo segmentado (SFA por sus siglas en inglés) fueron descritos por primera vez por Skeggs en 1957. En esta técnica las muestras se aspiran

secuencialmente hacia un flujo el cual esta segmentado por burbujas de aire, además de que es necesario incluir un ciclo de lavado entre cada muestra.

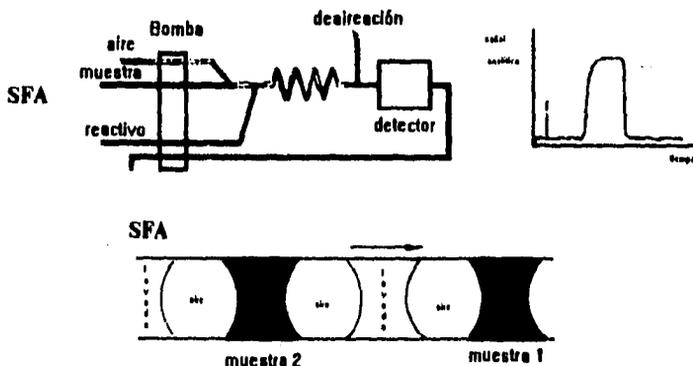


Figura 15. Esquema de la configuración de la técnica SFA.

Los métodos en flujo no segmentado incluyen a la técnica FIA (Análisis de Inyección en Flujo, por sus siglas en inglés) descritas por primera vez en 1974. Esta técnica difiere de la técnica SFA en que el flujo no está segmentado por burbujas de aire y por que en ésta se inyecta la muestra en lugar de aspirarla. Otra característica de esta técnica es que no es necesario llegar al equilibrio físico ni químico (22).

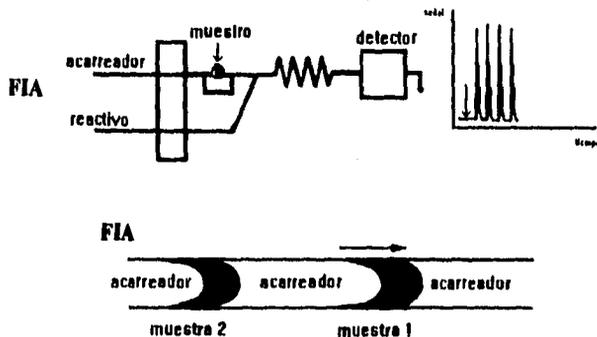


Figura 16. Esquema de la configuración de la técnica FIA.

Hasta antes del advenimiento de las técnicas en flujo continuo, todos los métodos automatizados de análisis se basaban en la automatización de las operaciones manuales siguiendo con el concepto de las operaciones individuales llevadas a cabo en el curso de un procedimiento manual, como se observa en la figura 17 (22).

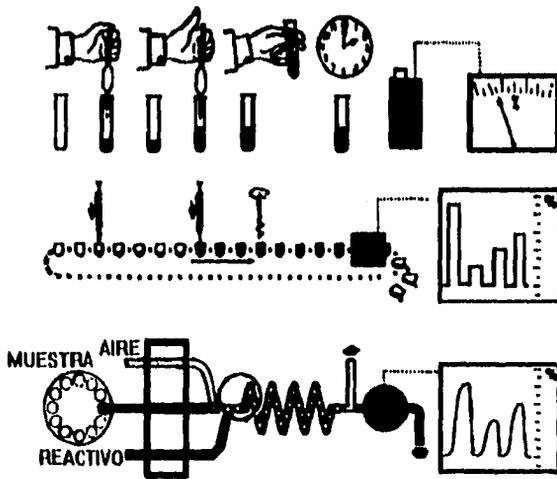


Figura 17. Paralelismo existente entre los ensayos manuales y las operaciones automatizadas que se tienen que llevar a cabo en el curso de un ensayo colorimétrico normal. a) Operación manual. b) analizador discreto c) Técnica SFA. (22)

La técnica FIA tienen varias ventajas sobre la SFA, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Comparación entre la técnica SFA y FIA. (23)

Parámetros	SFA	FIA
Introducción de la muestra	Aspiración	Inyección
Volumen de muestra	0.2-2 mL	10-100 μ L
Tiempo de respuesta	2-30 min	3-60 seg
Diámetro interno del tubo	2mm	0.5-0.7 mm
Detección realizada	en régimen de equilibrio	dispersión controlada
Capacidad	80 muestras/hora	300 muestras/hora
Precisión	1 a 2%	1 a 2 %
Gasto de reactivos	elevado	bajo
Ciclo de lavado	esencial	no esencial
Análisis cinético continuo	no es posible	flujo detenido
Valoraciones	no	si
Datos suministrados	altura del pico	altura, ancho, área, etc del pico.

3.2.3 Generalidades de la Técnica FIA

El concepto básico de la técnica FIA es la inyección de un volumen medido de muestra en un flujo portador, al cual se le pueden incorporar o no diferentes reactivos antes de su llegada al detector. No se alcanza el equilibrio, la medición es cinética (23).

Los principios básicos de esta técnica son:

- a) Inyección de la muestra.
- b) Dispersión controlada de la muestra.
- c) Sincronización Reproducible.

El concepto de FIA fue diseñado originalmente para automatizar ensayos seriados y ha emergido como una técnica general de manipulación de soluciones y de recopilación de datos (22).

La técnica FIA presenta las siguientes características esenciales.

1. El flujo es no segmentado.
2. La muestra se inserta o se inyecta directamente al flujo.
3. El bolo inyectado es acarreado a través del sistema. Durante este transporte puede ocurrir un proceso fisicoquímico, como por ejemplo, una reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.
4. La dispersión parcial o la dilución del analito se puede manipular a través de la operación de transporte controlando las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
5. Un sistema sensor continuo da una señal transitoria la cual es registrada.
6. Cuando se registra la señal, aun no se ha llegado a un equilibrio químico (finalización de la reacción) o a un equilibrio físico (homogenización de una porción del flujo).
7. El tiempo de operación debe ser altamente reproducible debido a que las mediciones se llevan a cabo bajo condiciones de no estabilidad, por lo que pequeñas variaciones pueden dar por resultado serias alteraciones en las lecturas. (24).

El esquema básico de un sistema FIA consiste en cuatro partes generales (22):

- Sistema de propulsión.
- Sistema de Inyección.
- Zona de reacción.
- Sistema sensor (detector).

1. La unidad de propulsión produce el flujo (a una velocidad tan constante como sea posible) de una o varias soluciones, ya sea que contengan un reactivo disuelto, o que simplemente actúen como portadores. Esta función puede ser realizada por una bomba peristáltica, un sistema de presión de gas o hasta por efecto de la gravedad. El método de propulsión más utilizado es una bomba peristáltica como la que se muestra en la figura 18 (22).

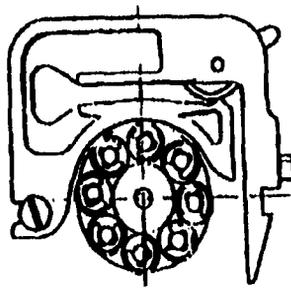


Figura 18. Esquema de una bomba peristáltica.

Esta bomba consiste en varios de cilindros que rotan simultáneamente oprimiendo una serie de manguera flexibles, las cuales se encuentran a 90° con respecto a los cilindros. La fuerza ejercida sobre las mangueras mueve a los fluidos que se encuentran en su interior. Se simula el movimiento peristáltico que ocurre en el esófago, estómago e intestinos, por medio del cual se empuja el alimento o los desechos por delante de la onda. Este movimiento es progresivo, ondulante e involuntario.

2. El sistema de inyección permite la entrada reproducible de un volumen medido de muestra al flujo sin detenerlo. Uno de los sistemas de inyección más utilizados son

las válvulas de inyección. A continuación se muestra una válvula de inyección en su posición de llenado y de vaciado.

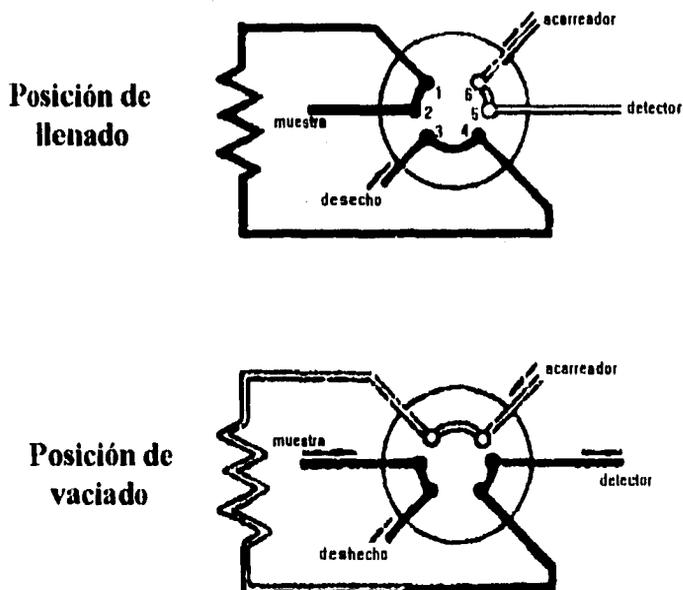


Figura 19. Esquema de una válvula de inyección.

3. La operación de transporte tiene lugar con o sin un proceso adicional, en una determinada cantidad de tubería comúnmente denominada reactor. El reactor puede ser un tubo recto, anudado o enrollado (que puede o no estar empacado con cuentas de vidrio inertes) o puede tratarse de una cámara de mezclado, o de un tubo empacado con un material químicamente activo (enzima inmovilizada, o una resina redox o de intercambio iónico) (22). En la figura 20 se muestran diversas clases de reactores utilizadas comúnmente.

- A. TUBO RECTO ABIERTO
- B. TUBO ENROLLADO
- C. CAMARA DE MEZCLADO
- D. REACTOR DE UN HILO
- E. REACTOR ENTRETEJIDO

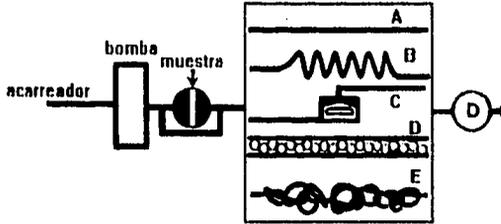


Figura 20. Diferentes tipos de reactores utilizados comúnmente.

4. La celda de flujo se coloca en un detector que traduce alguna propiedad del analito en una señal continua al detector y/o microcomputadora.



Figura 21. Esquema de una celda de flujo.

Los sistemas FIA pueden utilizar detectores selectivos y no selectivos por igual. Como ejemplos de detectores selectivos que se han utilizado en conjunción a la técnica FIA, se encuentran los espectrofotómetros de absorción atómica y los electrodos de oxígeno. Entre los no selectivos se pueden mencionar los espectrofotómetros UV-VIS y

los de infrarrojo. Para utilizar detectores no selectivos es necesario diseñar configuraciones FIA en las que se obtengan productos específicos a partir de reacciones con reactivos, las cuales pueden ser químicas, enzimáticas o inmunológicas.

Hasta aquí se ha representado a una técnica FIA normal, aunque la complejidad del sistema puede variar de acuerdo a la dificultad para transformar el analito en la especie detectable, para llevar a cabo titulaciones o para llevar a cabo mediciones cinéticas continuas. De acuerdo a lo anterior se ha modificado la técnica original para crear alternativas como lo son el FIA invertido (rFIA), la dilución electrónica y el "flujo-detenido".

3.2.4 Señales FIA

En un equipo de Inyección en Flujo, ocurren dos procesos simultáneamente: la dispersión física de la zona de muestra dentro de la disolución portadora del reactivo y la reacción química entre las moléculas del analito y las moléculas del reactivo. Debido a que el detector es sensible a las especies producidas en esta derivatización química, la señal tiene la forma de un pico, de altura (H), ancho (W) o área (A), los cuales contienen la información analítica.

En ausencia de reacciones químicas, cuando el detector responde de manera lineal e instantánea a la especie inyectada, no existe ninguna diferencia si se mide la altura, la amplitud o el área del pico, ya que todos proporcionan información útil, aunque la concentración del material inyectado se relaciona con cada uno de estos parámetros de manera diferente. Lo mismo se aplica a los ensayos basados en la producción de una especie medible, tal como en espectrofotometría, siempre y cuando exista un exceso del reactivo que reaccione con el bolo inyectado.

a) Altura del pico. Esta dimensión es la que más se utiliza ya que se puede identificar fácilmente y relacionar directamente con la respuesta del detector ya sea como absorbancia, conductancia, etc. De esta manera se puede relacionar la altura del pico con la concentración del analito:

$$H=kC$$

donde k es una constante de proporcionalidad.

b) Área del pico. Este parámetro también está relacionado directamente con la respuesta del detector, es decir,

$$A=kC$$

sin embargo, este tipo de lecturas tiene dos inconvenientes debidos a su carácter integral. El área del pico (A) no se puede relacionar con gradientes de concentraciones y afecta grandemente las lecturas de los detectores de tipo $\log(C)$ tales como los electrodos selectivos de iones, ya que parte de la respuesta que está cerca de la línea base tiene, en manera desproporcionada, mucho más peso que las porciones de las lecturas que se encuentran cerca a la parte más alta del pico.

c) Amplitud del pico. Este parámetro es proporcional al logaritmo de la concentración, por lo que tiene un amplio campo de posibilidades de uso aunque es menos preciso que las medidas de altura y área del pico. Proporciona una lectura en función a la diferencia del tiempo Δt entre las orillas ascendentes y descendentes del pico. Las titulaciones FIA y las aplicaciones FIA basadas en la medición de la amplitud del pico son técnicas de gradientes que dependen en la dimensión horizontal del pico, las cuales se pueden localizar en cualquier pico FIA cortado de manera horizontal en uno o varios niveles seleccionados a partir de la línea base (22). Estos métodos permiten extender el intervalo convencional de calibración en varios ordenes de magnitud.

d) Cola del Pico. Las mediciones en esta parte del pico se han utilizado para obtener una "dilución electrónica". Estas mediciones requieren un control preciso y acertado

sobre el periodo de retardo entre la inyección y la medición. También proveen una base para ajustar las condiciones iniciales de los métodos cinéticos en conjunción con el "flujo-detenido".

e) **Ascenso del pico.** Este parámetro es muy rápido como para poderse obtener a partir de él mediciones útiles bajo las condiciones FIA normales. Sin embargo si se extiende con la inserción deliberada de equipo que forma gradientes, tales como una cámara de mezclado bien agitada, los puntos en la parte de ascenso del pico pueden formar la base de una técnica de calibración.

Cuando la concentración de la muestra excede la del reactivo en una porción del perfil, lo cual se puede lograr con la inyección de volúmenes suficientemente grandes en una configuración de una línea, existen puntos en la parte ascendente y descendente del pico en los cuales la concentración de la muestra y de los reactivos se encuentran en relaciones estequiométricas. Estos son los puntos de equivalencia en una titulación por análisis en flujo (26).

Por lo tanto, una lectura FIA se puede obtener en diferentes formas, de las cuales la medición de la altura del pico es la más popular, debido a su simplicidad, ya que es el parámetro más fácil de localizar.

El control del tiempo es esencial para cualquiera de las opciones de lectura. De esta manera, en la señal FIA existen los siguientes parámetros relacionados con esta propiedad:

a) **Tiempo de residencia (T):** Es el periodo de tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y el máximo de la señal. Durante este periodo ocurre la reacción química.

b) **Tiempo de viaje (t_a):** Es el periodo de tiempo que transcurre desde la inyección hasta el inicio de la señal (aumento del 1 al 2% por encima de la línea base).

La diferencia entre estos dos parámetros $T - t_a$ es muy pequeña de acuerdo a las características del ancho de la señal FIA.

c) **Tiempo de regreso (T'):** Es el periodo de tiempo que ocurre entre el máximo de la señal FIA y su regreso a la línea base.

d) **Tiempo de línea base a línea base (ΔT):** es el intervalo de tiempo que transcurre desde el inicio de la señal hasta el regreso a la línea base. Este parámetro es una medida de la dispersión.

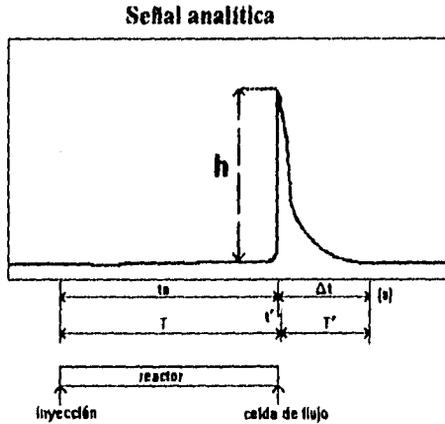


Figura 22. Parámetros de la señal FIA. (22)

De acuerdo a estas definiciones:

$$T + T' = t_a + \Delta T$$

$$\Delta T = t'' + T'$$

Debido a que las señales FIA no son curvas Gaussianas, estos parámetros no definen completamente el perfil del pico, especialmente en la parte que corresponde a la cola (22).

3.2.5 Dispersión

En el sistema FIA se debe tener control sobre la dispersión física ya que ésta define, en gran medida, la forma de la señal FIA.

La dispersión se define como la dilución que sufre el volumen de muestra inyectado al flujo y se caracteriza por el perfil de concentración adoptado por el bolo (24).

3.2.5.1 Coeficiente de difusión

Cuando se inyecta al sistema FIA una muestra homogénea en disolución con una concentración C_0 , se forma una zona de dispersión. La señal se deforma y se registra como un gradiente de concentraciones con una concentración máxima C_{max} como se muestra en la figura 23 (22).

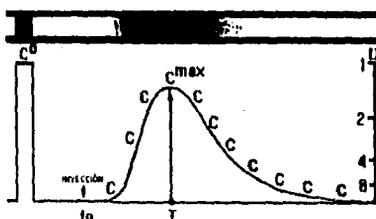


Figura 23. Gradiente de concentraciones provocado por la difusión del bolo de muestra en la disolución portadora.

El coeficiente de dispersión de Ruzicka fué el primer parámetro utilizado para caracterizar el paso de la muestra por el sistema. Se define como la relación de concentraciones antes y después del transporte a través de un sistema FIA dado:

$$D = C_0 / C$$

Por lo tanto cada punto en el registro de señales tiene un coeficiente de dispersión correspondiente. En el máximo de la señal:

$$D_{max} = C_0 / C_{max}$$

Ya que generalmente existe una relación directa entre la propiedad utilizada para la detección (absorbancia, fluorescencia, etc), la magnitud de la señal traducida y

la concentración de la muestra o su producto de reacción, el coeficiente de dispersión se puede determinar del radio de la altura de la señal encontrada en ausencia de dispersión (por ejemplo, el flujo continuo de la muestra sin diluir) y la de la señal FIA.

$$D_{\max} = k_0 h_0 / k_1 h_{\max} = h_0 / h_{\max}$$

donde k_0 y k_1 son constantes de proporcionalidad idénticas si la altura de la señal está relacionada linealmente a la concentración en el intervalo considerado. Por lo tanto, el coeficiente de dispersión se puede considerar como la relación de alturas de las señales.

El método más sencillo para medir el coeficiente de dispersión consiste en inyectar un volumen conocido de colorante a un flujo de disolución portadora incolora, midiendo la absorbancia de la zona dispersa del colorante con un espectrofotómetro (22).

Se han establecido ciertos límites a la dispersión, con la finalidad de obtener resultados reproducibles y confiables; la clasificación se muestra a continuación (23).

Difusión limitada:	$1 < D < 3$	cuando no se requiere de reacción química.
Difusión media:	$3 < D < 15$	Cuando se requiere reacción química.
Difusión alta	$D > 15$	para valoraciones FIA.

3.2.5.2 Influencia de varios factores en la dispersión

La dispersión total dentro del sistema FIA se puede considerar como una suma de las dispersiones que ocurren en tres partes diferentes dentro del sistema:

$$D = D_{\text{inyección}} + D_{\text{transporte}} + D_{\text{detector}}$$

La Dinyección es la dispersión debida al volumen de muestra y a los aspectos geométricos del sistema. La Dtransporte incluye las contribuciones de la geometría del reactor y la velocidad de flujo ; ésta es la contribución más importante a la dispersión total. La Ddetector se refiere a la contribución de la geometría de la celda de flujo (forma y dimensiones) a la dilución.

a) Factores hidrodinámicos: Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión de la muestra inyectada: el transporte convectivo y el difusional (24).

- El transporte convectivo ocurre bajo condiciones de flujo laminar, ya que dentro del sistema FIA el movimiento del fluido es suave y no agitado y fluctuante como sería si imperara un flujo turbulento. El parámetro primario que determina el comportamiento viscoso o no de un fluido Newtoniano es el número adimensional de Reynolds, el cual se define de la siguiente manera:

$$Re = dVL/\mu$$

donde d es la densidad del fluido, μ es el coeficiente de viscosidad y V y L la velocidad y longitud características del flujo. Este parámetro también nos sirve para determinar si un flujo es turbulento o laminar, de manera que en el flujo laminar, el número de Reynolds siempre es menor a 1×10^3 , mientras que en el turbulento es mayor a 1×10^4 , dándose la transición entre 1×10^3 y 1×10^4 .

Lo anterior da por resultado un perfil de velocidad parabólico.

TRANSPORTE CONVECTIVO

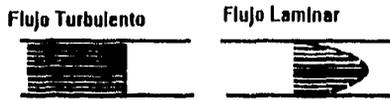


Figura 24. Transporte convectivo dentro de un sistema FIA.

- El transporte difusional ocurre bajo condiciones de difusión axial y radial debido a los gradientes de concentración en el régimen de transporte convectivo. La difusión axial se debe a los gradientes de concentración horizontal y contribuye de manera insignificante a la dispersión total. La difusión radial se debe a las diferencias de concentración perpendiculares a la dirección del flujo y hace una contribución importante a la dispersión total. Esta difusión tiende a balancear la concentración para lograr una disminución de la dispersión. Este tipo de difusión asume un papel semejante a las burbujas de aire en el SFA, generando un flujo turbulento, con la ventaja de que no es necesario llegar al equilibrio químico para obtener una señal analítica válida.

TRANSPORTE DIFUSIONAL

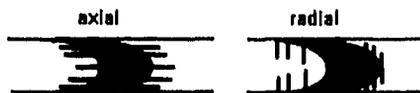


Figura 25. Transporte difusional dentro de un sistema FIA.

El perfil de concentraciones del bolo es dependiente del tiempo así como las contribuciones de los diferentes tipos de transporte.

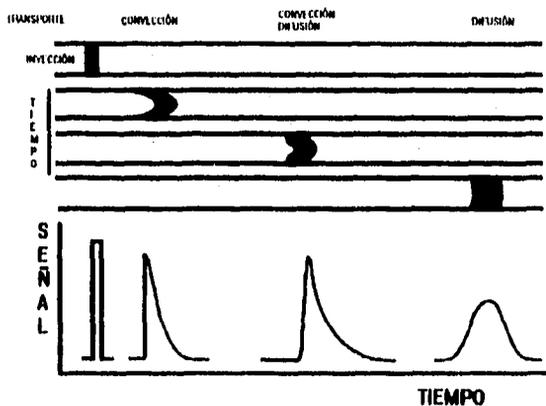


Figura 26. Influencia del tiempo y de los tipos de transporte en la difusión.

b) Volumen de muestra: Cuando la muestra reacciona completamente, se obtiene un solo pico, angosto y alto. La dispersión disminuye al aumentar el volumen de muestra, por lo que se logra un aumento en la altura del pico y en la sensibilidad de medición, como se muestra en la figura 27. De manera similar, la dilución de las muestras muy concentradas se puede lograr mediante la reducción de los volúmenes inyectados. Si el volumen inyectado es muy grande no se logra un mezclado adecuado, por lo que se obtendrá una señal con una meseta o con dos picos.

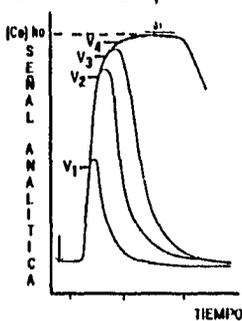


Figura 27. Influencia del volumen de muestra en la dispersión.

c) **Flujo:** Al disminuir el flujo existe un aumento en la dispersión; es decir, son inversamente proporcionales.

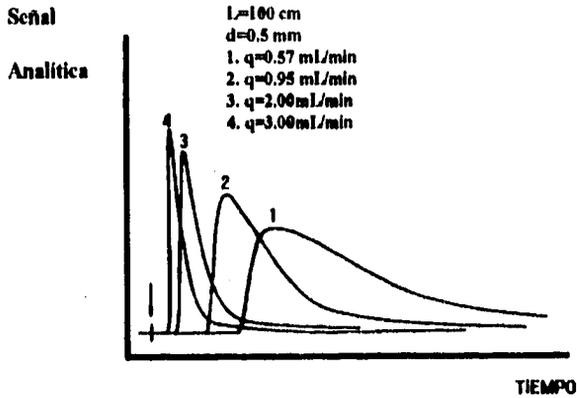


Figura 28. Influencia del flujo en la dispersión.

d) **Longitud del reactor:** Al aumentar la longitud del reactor y de las tuberías, se aumenta el tiempo de residencia, provocando la aparición de difusión de tipo axial y por lo tanto un aumento en la dispersión así como en el tiempo de viaje, como se observa en la figura 29.

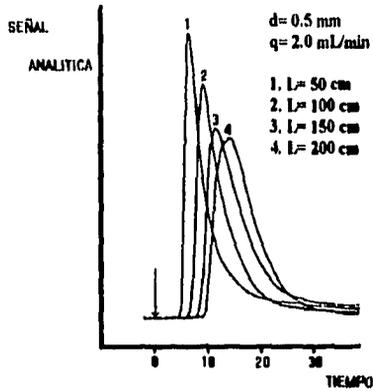


Figura 29. Influencia de la longitud del reactor en la dispersión.

e) **Diámetro del tubo:** Al aumentar el diámetro de la tubería se provoca un aumento en la dispersión debido a un aumento en la difusión radial. En la figura 30 podemos observar un aumento en la altura de la señal al disminuir el diámetro del reactor, lo cual lleva a una disminución en la dispersión como ya se había discutido previamente (página 46).

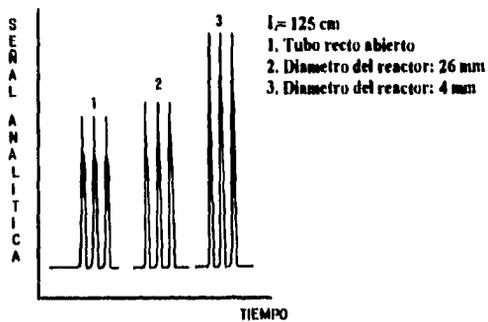


Figura 30. Influencia del diámetro del tubo en la dispersión.

f) Geometría del reactor: El reactor enrollado o de "serpentin" ha sido el más utilizado aunque también se han utilizado otras geometrías dependiendo de las necesidades del sistema FIA que se esté desarrollando.

La función del reactor es la de aumentar la intensidad del mezclado radial, disminuyendo de esta manera la difusión axial, logrando también un mayor mezclado de los reactivos con la muestra. Dependiendo de la geometría del reactor, se aumenta en mayor o menor grado el coeficiente de difusión, como se muestra en la figura 31.

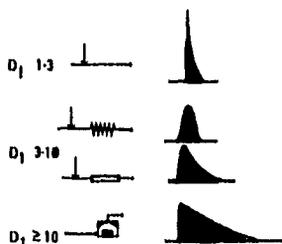


Figura 31. Influencia de la geometría del reactor en la dispersión.

3.2.6 Características y ventajas de los sistemas FIA

1. Sensibilidad.

Como regla, los sistemas FIA son menos sensibles que sus contrapartes manuales y SFA por dos razones: a) No se llega al equilibrio debido a que el tiempo de reacción es corto, y b) La dispersión física o dilución de la muestra en la disolución portadora resulta en una señal de menor intensidad a la que se obtendría con el bolo sin diluir.

Gracias a la gran flexibilidad de esta técnica, es posible introducir modificaciones a las configuraciones, con la finalidad de aumentar la sensibilidad. El uso de sistemas de separación continuos incorporados a la configuración FIA aumentan la sensibilidad, como por ejemplo el uso de microcolumnas empacadas. También se puede mejorar la sensibilidad utilizando la técnica de "flujo detenido" sin aumentar el grado de dilución. Esta técnica se basa en el monitoreo continuo de la señal mientras el flujo permanece detenido una vez que ha llegado al detector. También es esencial considerar la sensibilidad del detector que se haya escogido.

2. Selectividad.

La adaptación de un método convencional a un método FIA implica, en general, una reducción grande o pequeña del número de interferencias y su nivel de tolerancia. Los mayores niveles de tolerancia para especies no deseadas en los métodos FIA se deben a los aspectos cinéticos. La selectividad es mayor debido a que las reacciones no deseadas no se desarrollan a un nivel significativo en el corto periodo de medición. El descenso en las interferencias es aún más notorio en los métodos FIA donde se mide la velocidad de reacción, tales como las técnicas a "flujo detenido". Debido a la versatilidad de los métodos FIA, es fácil optimizar las configuraciones a fin de reducir la perturbación de especies extrañas. Otro aspecto positivo de las técnicas FIA es que el uso de sistemas cerrados evita que los reactivos y las muestras tengan reacciones no deseadas con el bióxido de carbono y con el oxígeno presentes en la atmósfera.

3. Precisión.

La reproducibilidad de las técnicas FIA es comparable a la que presentan los métodos continuos en flujo segmentado. El equipo se puede utilizar en ensayos seriados con una desviación estándar relativa mejor al 1%.

4. Rapidez.

Esta es una de las características más sobresalientes de los métodos FIA, los cuales son más rápidos que sus contrapartes manuales. La frecuencia con la que se pueden analizar muestras es mucho mayor en los métodos FIA que en los manuales. La gran velocidad de análisis de muestras inherente a los sistemas FIA se puede atribuir a las fuerzas de difusión radial, las cuales tienen mayor influencia que las fuerzas de difusión axial y convección. Otros factores como son el volumen de muestra, el volumen interno del reactor y la velocidad de flujo tienen también influencia en la frecuencia con la que se analizan las muestras.

5. Simplicidad.

Las técnicas FIA presentan una gran simplicidad derivada de las siguientes características.

- Su fundamento simple en el cual se hace una pequeña modificación conceptual a los métodos SFA. Las burbujas de aire se sustituyen por modificaciones geométricas e hidrodinámicas en el sistema.
- Los arreglos experimentales son simples a base de tubos de teflón, bifurcaciones y conectores a diferencia de las nuevas metodologías analíticas.
- Fácil manejo; no solo el uso de las configuraciones FIA para el análisis rutinario, sino también para manipular el diseño y obtener los resultados deseados.

6. Economía.

Las técnicas FIA se caracterizan por su bajo costo si se comparan con las de flujo continuo segmentado y los analizadores discretos o en lote. El costo de un instrumento FIA es solo de 20 a 50% el de los analizadores automáticos de construcción especial. La metodología FIA también se caracteriza por su gran potencial

para la construcción de configuraciones "hechas en casa" a partir de piezas baratas. También se puede considerar como una técnica económica en el consumo de reactivos, ya que se gastan de 20 a 100% menos reactivos que en las técnicas manuales.

7. Versatilidad.

La naturaleza modular de un sistema FIA permite su adaptabilidad a una gran variedad de necesidades en la Química Analítica. Resulta sencillo cambiar un componente por otro ya que no existen presiones altas involucradas. Las configuraciones se pueden armar en unos cuantos minutos y se pueden optimizar fácilmente (24).

Otra de las grandes ventajas de las técnicas FIA es su gran capacidad para ampliar el intervalo de condiciones bajo las cuales se puede llevar a cabo el análisis químico .

El concepto de manipulación de muestra en una configuración cerrada permite que todo el procedimiento analítico, incluyendo el proceso químico (reacción, extracción y preconcentración), el proceso físico (dilución y separación de fase) así como la detección, se lleve a cabo en un ambiente aislado del laboratorio y no sufrir así las restricciones a que obliga la compatibilidad con las condiciones ambientales.

Utilizando las técnicas FIA se pueden llevar a cabo procedimientos analíticos bajo condiciones no ambientales como lo son alta pureza, alta presión y temperatura controlada (26).

3.3. Métodos de determinación de fenoles.

Las técnicas más utilizadas para la detección y cuantificación de fenoles son:

- **Espectrofotometría UV-VIS.**
- **Cromatografía de Gases (CG).**
- **Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).**
- **Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPLC, por sus siglas en Inglés).**
- **Análisis Titulométrico.**

a) Espectrofotometría UV-VIS

Se han utilizado varias reacciones con fenoles para dar como productos finales compuestos que absorben luz visible. Estas reacciones se pueden utilizar en la detección cualitativa y para el análisis cuantitativo. Entre las reacciones que se han utilizado para el análisis cuantitativo de fenoles totales, se encuentran las reacciones de copulación con sales de diazonio y las reacciones de coloración con cloruro férrico, ácido nitroso-nitrato mercúrico, reactivo de Gibbs, vainillina con ácido p-toluen sulfónico, ferricianuro férrico, vanadato de amonio y con antipirina (27).

El método más antiguo para la identificación de compuestos fenólicos es el que produce sales de indofenol de color azul intenso. En la producción de estos compuestos se basa el método Liebermann para el análisis de fenoles, el cual produce indofenoles a partir de la reacción con ácido sulfúrico (28).

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos se recomienda como ensayo para la identificación de fenol, la reacción con cloruro férrico a fin de producir un compuesto de coloración violeta (29).

En aguas residuales, el método que se recomienda para el análisis de fenoles totales involucra la reacción con 4-aminoantipirina en la presencia de ferrocianuro de potasio a un pH de 8 para formar un colorante amarillo de antipirina. Utilizando este método es posible determinar fenol, fenoles *orto* y *meta* sustituidos, y bajo condiciones apropiadas de pH, los *para* sustituidos, siempre que el sustituyente sea carboxilo, un halógeno, un metoxilo o un grupo de ácido sulfónico. El método con 4-amino antipirina no identifica fenoles *para* sustituidos por grupos alquilo, arilo, nitro, benzilo, nitroso o aldehídos. Debido a que la sustitución generalmente reduce la respuesta, el valor que se obtiene representa la concentración mínima de compuestos fenólicos.

La cantidad mínima detectable de este método para muestras libres de impurezas es de 1 µg fenol/L en 500 mL de destilado de fenoles (29).

El análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos en extractos biológicos se puede llevar a cabo de diferentes maneras. Una de las reacciones que más se ha utilizado es la de copulación con la sal de diazonio formada a partir de la reacción de *p*-nitroanilina y nitrito de sodio en presencia de acetato de sodio y goma arábiga. El compuesto resultante se mide espectrofotométricamente a 550nm. El método más confiable para la determinación de fenoles totales se basa en la oxidación con el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual contiene fosfomolibdato de sodio y tungstato de sodio. La intensidad del producto azul resultante se puede medir con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 725 nm (30).

El contenido de polifenoles totales en cerveza se mide utilizando la reacción con citrato férrico de amonio. Un método alternativo para la medición en vinos involucra la reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu (31).

No existe una longitud de onda única ideal para el monitoreo de todas las clases de compuestos fenólicos, ya que exhiben una absorción máxima a diferentes longitudes de onda.

b) Cromatografía de Gases

Se ha utilizado esta técnica para el análisis de fenoles individuales. El análisis por Cromatografía de Gases requiere del uso de los detectores de ionización de flama o de captura de electrones. Se recomienda el uso de un detector de ionización de flama para la determinación de los fenoles sin derivatizar y el de captura de electrones para los fenoles derivatizados. La derivatización de los fenoles elimina los efectos de las interferencias.

En aguas residuales los fenoles se puedan analizar con el método 604 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), basado en el uso de Cromatografía de Gases con detector de ionización de flama o de captura de electrones (32).

El análisis de fenoles y cresoles en el aire se puede llevar a cabo utilizando los métodos 3502 y 2001 (1984) respectivamente del Instituto Nacional de Seguridad y Salud Profesional (NIOSH, por sus siglas en inglés). Para el análisis de ambos compuestos, el detector que se utiliza es el de ionización de flama.

Se puede analizar pentaclorofenol en sangre u orina mediante la inyección directa de la muestra utilizando como detector el de captura de electrones según los métodos NIOSH 8001 y 8303 (1984) (18).

La determinación cuantitativa del fenol contenido como agente microbiano en ciertos productos se lleva a cabo por cromatografía de gases según el método recomendado por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Se utiliza un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama (29).

c) CG/EM

Se ha utilizado esta técnica para el análisis de fenoles individuales y para la identificación de fenoles desconocidos.

El análisis de aguas residuales, suelos, y residuos sólidos mediante esta técnica se puede realizar utilizando el método EPA 625 (EPA 1984), el 8270 utilizando columna capilar y el 8250 para columna empacada (EPA 1986) (18).

También se ha utilizado la Espectrometría de Masas de impacto de electrones, de ionización química y de bombardeo rápido de átomos para la identificación de varios flavonoides, taninos oligoméricos hidrolizables, glucósidos polifenólicos y procianidinas (27).

Esta técnica también ha sido utilizada para la determinación de la estructura de los polifenoles.

d) HPLC

Se ha utilizado esta técnica para el análisis de fenoles individuales y para separar y cuantificar a los polifenoles individuales en frutas y vegetales. Esta técnica tiene como ventajas sobre otros procedimientos cromatográficos, la sensibilidad, la velocidad y la facilidad de uso. El uso de esta técnica acoplada a un espectrofotómetro de arreglo de diodos es ideal para el análisis de mezclas complejas de polifenoles (27).

La mayoría de los estudios de toxicidad reportados en la literatura se basan en el uso de la técnica HPLC utilizando como detector un espectrofotómetro UV-VIS (27).

e) Análisis Titulométrico

La valoración de los compuestos fenólicos se puede llevar a cabo disolviendo 2g de muestra sólida en agua y aforando hasta 1 L. Se pasan 25 mL de esta solución a un matraz con tapón y se agregan 50 mL de una disolución 0.05M de bromo y 5 mL de HCl. Se tapa el matraz, se agita ocasionalmente durante 30 minutos y se deja reposar 15 minutos. Se agrega rápidamente 5 mL de solución al 20% m/v de yoduro de potasio. Se agita vigorosamente y se titula con disolución 0.1M de tiosulfato de sodio hasta que permanezca un color amarillo pálido. Agregar 1 mL de disolución estandarizada de

almidón y 10 mL de cloroformo y continuar titulando agitando vigorosamente. Hacer la determinación en blanco y efectuar las correcciones necesarias. Cada mL de solución 0.05M de bromo equivale a 1.569 mg de fenol (29).

f) Cromatografía en Papel

En extractos biológicos los compuestos fenólicos individuales se pueden medir cualitativamente con cromatografía en papel (30).

g) Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina se ha utilizado ampliamente para la determinación de polifenoles, especialmente para la separación de antocianidinas, ya que se trata de una técnica muy efectiva, conveniente y de bajo costo económico (27).

La técnica que se escoja para el análisis de fenoles dependerá de las necesidades que se tengan; así por ejemplo, si se requiere el análisis de un gran número de muestras, con una alta precisión y al menor costo que sea posible, la alternativa que se tiene es el uso de técnicas automatizadas. En este caso, una buena opción es el uso de la técnica FIA acoplada a un detector UV-VIS, siendo éste último, fácil de conseguir. Si se desea un análisis más completo, se puede utilizar como detector un espectrofotómetro de arreglo de diodos para monitorear a diferentes longitudes de onda, aunque éstos tienen un costo más elevado que los espectrofotómetros convencionales y son menos sensibles.

Si se busca la separación y cuantificación de mezclas complejas de fenoles, pero sin llegar a la identificación positiva de cada componente; se necesita una alta precisión (2-5%) pero solo se cuenta con cantidades pequeñas de muestra (nanogramos), la técnica a utilizar es la Cromatografía de Gases (CG). Para ser posible el uso de esta técnica, la muestra debe ser volátil y estable térmicamente. Aunque el

número de muestras que se pueden analizar con el uso de esta técnica es alto, no se puede comparar con el número de muestras que es posible analizar con técnicas automatizadas, además de que el costo de los ensayos individuales es mucho mayor que cuando se utiliza la técnica FIA. El análisis de fenoles en matrices simples es posible con el uso de esta técnica.

Si se desea la separación e identificación de muestras que contengan compuestos fenólicos, se puede utilizar la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopía de Masas siempre y cuando se quiera sacrificar el número de muestras que se analicen por día, ya que utilizando esta técnica solamente se pueden analizar de 8 a 10 muestras diarias. El precio del equipo de CG/EM es muy elevado si se compara con el precio del equipo de las técnicas FIA.

Si se necesita el análisis y separación de compuestos no volátiles, como por ejemplo polifenoles, la técnica que se debe utilizar es HPLC, aunque se debe tomar en cuenta el error introducido por el uso de columnas empacadas, ya que la sensibilidad de la columna es muy sensible al método utilizado para el empacado. Al igual que con el uso de las técnicas CG/EM, el costo del equipo es elevado en comparación con el equipo FIA.

Si se necesita la detección cualitativa de compuestos fenólicos, o cuantitativa sacrificando la precisión (5-10%), la técnica que se debe utilizar es la Cromatografía en Capa Fina. El uso de esta técnica es de bajo costo aunque se debe tomar en cuenta el error debido a las características de migración, ya que éstas son muy sensibles a las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo el análisis.

Por lo tanto, el uso de las técnicas FIA para el análisis de fenoles ofrece un gran número de ventajas sobre otras técnicas, además de que es posible acoplar esta técnica a procesos industriales en el muestreo en línea (on-line), lo cual abre otra gran variedad de posibilidades de análisis.

3.3.1 Metodologías FIA desarrolladas para la determinación de fenoles.

Se han desarrollado varios métodos FIA para la determinación de compuestos fenólicos debido a su gran importancia como contaminantes orgánicos.

La mayoría de las configuraciones desarrolladas tienen como objetivo automatizar los métodos colorimétricos utilizados comúnmente para la identificación de estos compuestos; sin embargo, se han realizado algunas modificaciones. Se ha conjuntado el proceso de extracción con el de preconcentración y se han utilizado espectrofotómetros de arreglo de diodos a fin de realizar lecturas a diferentes longitudes de onda. Así mismo, se han utilizado otro tipo de detectores como por ejemplo los amperómetros o los electrodos de oxígeno.

Uno de los métodos colorimétricos que más se ha utilizado para el desarrollo de configuraciones FIA para la determinación de fenoles es el que involucra la reacción con 4-aminoantipirina. Un ejemplo de estas configuraciones es:

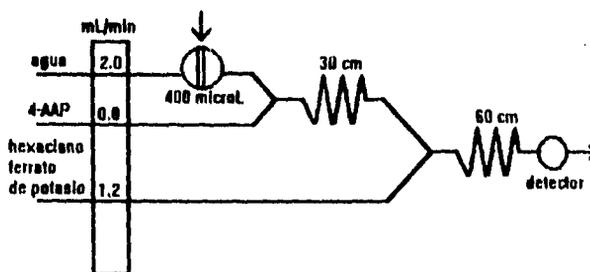


Figura 32. Configuración FIA desarrollada para el análisis de compuestos fenólicos basada en la reacción colorimétrica con la 4-aminoantipirina.

El hexacianoferrato de potasio tiene la función de oxidante. Utilizando esta reacción se corroboraron algunos de los problemas que representa el uso de esta reacción colorimétrica, ya que por ejemplo, varios fenoles sustituidos no reaccionan con la 4-aminoantipirina. Otro problema es que aunque la mayoría de los productos de reacción de los distintos fenoles son de color rojo con una longitud de onda máxima de absorción en la vecindad de 510 nm, otros compuestos fenólicos producen compuestos de color azul, verde o morado, por lo que se hace necesario la utilización de un espectrofotómetro de arreglo de díodos. El último problema que tiene este método es la insuficiente sensibilidad para detectar niveles de $\mu\text{g/L}$ de fenol sin el uso de métodos de preconcentración (33).

También se ha utilizado esta reacción para desarrollar una configuración que sirva para la determinación de fenoles en queroseno y en nafta; utilizando una celda de preconcentración la cual contiene una membrana SILASTIC de elastómero de silicón.

Con el uso de este método fue posible la determinación de manera exitosa de compuestos fenólicos en queroseno y nafta (34).

Otro método colorimétrico que se ha utilizado para el desarrollo de una configuración FIA que sirva para determinación de compuestos fenólicos es la copulación oxidativa de estos con 2-metil-2-benzotiazolina-hidrazona (MBTH).

El uso de esta reacción tiene mayor sensibilidad que el método que utiliza la 4 amino antipirina, además de que muchos de los compuestos que no reaccionan con la 4-AAP si lo hacen con la MBTH (33).

Se ha llevado a cabo la cuantificación de compuestos fenólicos utilizando extractos de tejido biológico, aprovechando la actividad enzimática de estos últimos. Se elaboraron disoluciones extraídas de hojas de espinaca y de pulpa de plátano y se introdujeron como portadoras a una configuración FIA. El consumo de oxígeno de la polifenol oxidasa y de la catecol oxidasa sobre sus respectivos sustratos se monitoreo con un electrodo de oxígeno. La determinación selectiva de los polifenoles fue posible

utilizando el jugo de los tejidos biológicos en lugar de utilizar las soluciones purificadas de enzimas de alto costo económico. Este método no tiene una alta selectividad debido a la falta de especificidad de la actividad enzimática (35).

También existen varios trabajos donde se exponen configuraciones FIA cuyo objetivo es la determinación de pesticidas con actividad biológica. Las determinaciones se llevan a cabo hidrolizando el pesticida y cuantificando los compuestos fenólicos obtenidos de esta forma.

Uno de los ejemplos de estas configuraciones es la que se utiliza para la cuantificación de formetanato y su producto de hidrólisis, el *m*-aminofenol aprovechando su reacción con *p*-aminofenol en presencia de KIO_4 como oxidante. El colorante azul producido se mide espectrofotométricamente a 576nm.

La muestra se inyecta en NaOH a fin de llevar a cabo la hidrólisis. Posteriormente el MAP, producto de la hidrólisis, reacciona con la benzoquinonamina producida a partir de la reacción del PAP con el KIO_4 , a fin de formar el producto de copulación que se mide en un espectrofotómetro.

Este método automatizado permite el seguimiento de la degradación del formetanato en agua (36).

Otro ejemplo de estas configuraciones es la utilizada para cuantificar Carbofuran, Propoxur y Carbaryl, todos pesticidas de la familia de los carbamatos.

La determinación se basa en la hidrólisis de estos a sus correspondientes fenoles, para que después participen en una reacción de copulación con una sal de diazonio. Los azo-compuestos formados se miden con un espectrofotómetro de arreglo de diodos a diferentes longitudes de onda.

La configuración desarrollada es la siguiente:

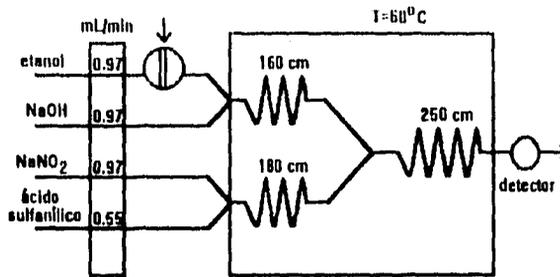


Figura 33. Configuración FIA desarrollada para el análisis de pesticidas de la familia de los carbamatos sin una separación cromatográfica previa.

También se utilizó esta configuración con una celda de flujo empacada con C-18 a fin de aumentar la sensibilidad (37).

Se ha desarrollado también una configuración FIA para la cuantificación del pesticida organofosforado paratión aprovechando su hidrólisis a p-nitrofenol. La cuantificación de este último se lleva a cabo con un amperómetro (38).

En todas las configuraciones estudiadas se hace uso de la técnica FIA normal, es decir, la muestra es inyectada a través de una válvula de inyección a la disolución portadora, el cual puede o no contener a los reactivos.

En la mayoría de las configuraciones se hace uso de una celda de concentración o de algún otro dispositivo para aumentar la sensibilidad de detección.

Casi siempre se utiliza como disolución portadora agua a excepción de aquellas configuraciones en las que se necesita la hidrólisis de algún pesticida para producir el fenol; en estos casos, el portador es una disolución de NaOH.

Los detectores más utilizados son los espectrofotómetros UV-VIS aunque otra de las opciones prometedoras es el uso de un espectrofotómetro de arreglo de diodos.

La reacción de copulación con una sal de diazonio es una de las opciones más viables para el análisis de fenoles como se estudió su eficacia en el análisis de pesticidas en la familia de los carbamatos en el intervalo de partes por billón.

Por lo tanto, la cuantificación de fenoles utilizando la técnica FIA se ha realizado ampliamente y en diferentes muestras. Se cuantifican, como productos de hidrólisis de pesticidas o como componentes de tejidos biológicos.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1. Reacción de cuantificación.

La reacción que se seleccionó para desarrollar un método FIA para la determinación de fenoles fue la de copulación con sulfanilamida diazotizada. Esta reacción ha sido muy utilizada para la determinación de una gran cantidad de fenoles, además de que ha sido estudiada extensivamente por lo que la optimización de las variables químicas será predecible. Otra ventaja del uso de esta reacción es que es relativamente sencilla de automatizar.

La reacción global que se lleva cabo es la siguiente:

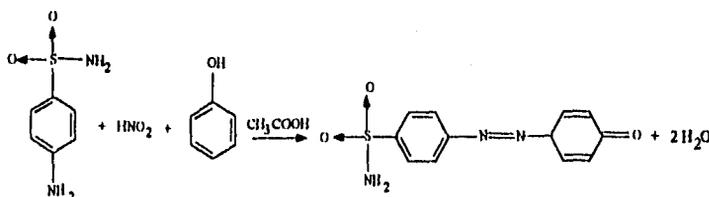


Figura 34. Reacción de Cuantificación.

Primero se lleva a cabo la formación de la sal de diazonio (figura 35) y posteriormente, la sal de diazonio formada reacciona con el compuesto fenólico para producir, mediante una reacción de copulación, al azo-compuesto (figura 36).

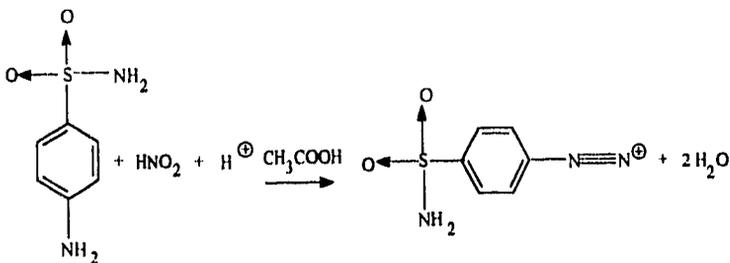


Figura 35. Formación de la sal de diazonio.

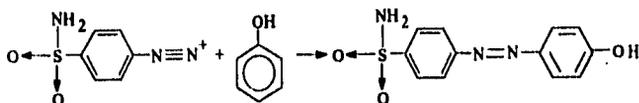


Figura 36. Formación del azo-compuesto.

4.2. Desarrollo de la Metodología FIA.

La configuración FIA que se diseñó para la automatización de la reacción seleccionada se muestra en la figura 37.

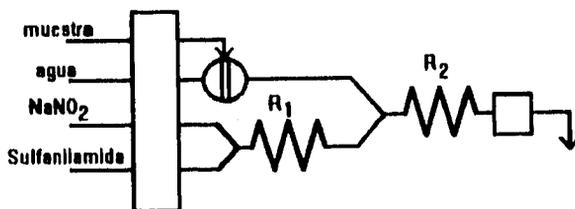


Figura 37. Configuración FIA desarrollada para el análisis de compuestos fenólicos.

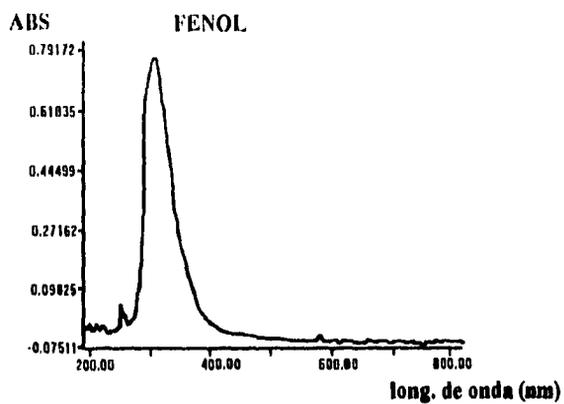
Se desarrolló una configuración FIA normal de cuatro canales. Como sistema de propulsión se utilizó una bomba peristáltica Gilson Miniplus 3 de 8 canales. Los estándares de la muestra se elaboraron en medio alcalino, con la finalidad de tener la mayor cantidad posible de fenol como ión fenóxido, mientras que tanto la sulfanilamida como el nitrito de sodio se disolvieron en una disolución de ácido acético al 30% v/v.

La muestra se inyectó directamente en una disolución portadora de agua destilada con ayuda de una válvula de inyección marca Rheodyne tipo 50 de seis compuertas y con una capacidad de 120 μL . La tubería que se utilizó es de teflón con un diámetro interno de 0.5 mm.

En el reactor 1 se lleva a cabo la formación de la sal de diazonio a partir de la reacción del nitrito de sodio y la sulfanilamida, mientras que en el segundo reactor ocurre la formación del azo compuesto producto de la reacción de copulación del fenol con la sulfanilamida diazotizada.

Las celdas de flujo utilizadas son de marca Starna de cuarzo con un paso óptico de 1 cm y una capacidad de 70 μL . Las dimensiones de la cámara de la muestra son 3 mm de ancho y 10 mm de largo. El sistema de detección es un Espectrofotómetro Cary 1 UV-VIS de la compañía Varian, equipado con una computadora EPSON EL2, monitor a color EPIX VGA y una impresora EPSON LX-810.

Una vez que la configuración estuvo lista, se obtuvo el espectro del azo compuesto. Se inició el flujo y cuando el compuesto formado se encontraba en la celda de flujo se detuvo la bomba y se obtuvo el espectro. A continuación se presenta el espectro del compuesto formado.



Gráfica 1. Espectro de absorción del azo-compuesto formado a partir de la reacción del fenol con la sulfanilamida diazotizada dentro del sistema FIA.

4.3. Optimización de la Configuración FIA Desarrollada.

La optimización de un sistema FIA es el acto de evaluar la dispersión y el mezclado del bolo de muestra con los reactivos contra el tiempo necesario para lograr la conversión del analito a la especie detectable (26).

Es necesario controlar la dispersión con la finalidad de optimizar la señal obtenida y lograr un análisis con la mayor sensibilidad posible invirtiendo el menor tiempo.

La optimización del sistema se llevó a cabo utilizando como muestra fenol con una concentración de 0.1M; cada estándar se preparó con una cuarta parte de NaOH en lentejas por cada parte de fenol. Las condiciones iniciales de las que se partieron son las siguientes:

Flujo de muestra:	0.97 mL/min
Flujo del NaNO_2 :	0.97 mL/min
Flujo de la disolución portadora:	0.97 mL/min
Flujo Sulfanilamida:	0.55 mL/min
Volumen de Muestra:	220 μL
Concentración del NaNO_2 :	0.2% p/v en una solución de CH_3COOH al 30% v/v
Concentración de la Sulfanilamida:	0.2% p/v en una solución de CH_3COOH al 30% p/v
Temperatura:	Ambiente

Se decidió utilizar estas condiciones, tomando como base el artículo escrito por Fernandez-Band (37) en el que se hace uso de una configuración similar para la determinación de pesticidas organofosforados.

Cuando se probó la configuración utilizándose estas condiciones, no se obtuvo señal, por lo que se cambió el volumen de inyección de 220 μ L a 620 μ L, obteniéndose una señal clara. La optimización se empezó a llevar a cabo utilizando este volumen de inyección.

Las condiciones se variaron en el siguiente orden:

1. Concentración de Sulfanilamida.
2. Concentración de NaNO₂.
3. Flujo.
4. Volumen de Muestra.
5. Longitud de los reactores.
6. Temperatura.

Conforme se iban optimizando las condiciones, se mantenían constantes las condiciones optimizadas y se variaba la que seguía en orden.

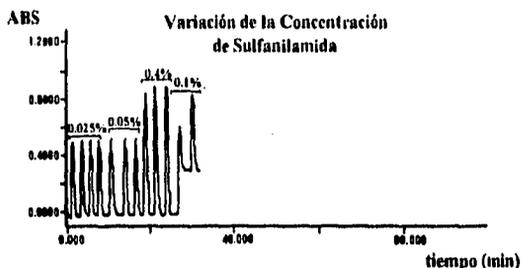
4.3.1. Resultados

4.3.1.1 Concentración de Reactivos

(a) Concentración de Sulfanilamida

Al variar la concentración de este reactivo se observó que en el intervalo de concentraciones de 0.025% p/v a 0.05% p/v se observó un pequeño aumento en la absorbancia al aumentar la concentración. Al aumentar la concentración de sulfanilamida por encima de 0.1% p/v se observó que ya no existía reproducibilidad ya que el tamaño de los picos era diferente en inyecciones sucesivas; sin embargo, al utilizar una concentración de 0.4% p/v se volvió a

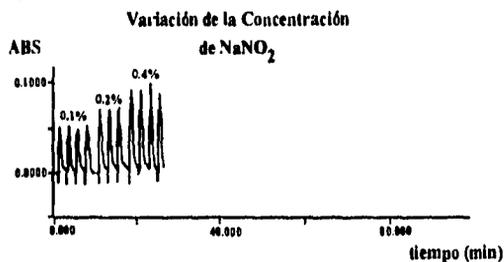
obtener reproducibilidad. Por lo tanto la concentración óptima de Sulfanilamida es 0.05% p/v, ya que utilizando esta concentración se obtiene una buena intensidad de señal con un pequeño gasto de reactivo.



Gráfica 2. Diagrama obtenido al variar la concentración de sulfanilamida.

(b) Concentración de Nitrito de Sodio

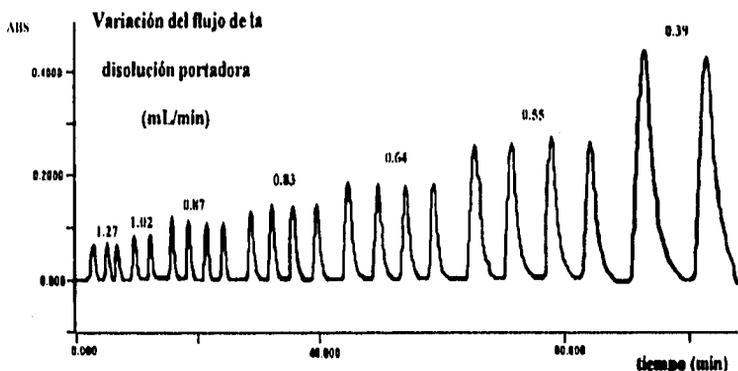
Al variar la concentración de nitrito de sodio, se observó que en el intervalo de 0.1% p/v a 0.4% p/v aumentaba la altura de la señal FIA al aumentar la concentración. A concentraciones superiores de 0.4% p/v existieron muchos problemas por la formación de muchas burbujas de NO provenientes de la dismutación del ácido nitroso a pH ácido, por lo que ya no se aumentó más la concentración.



Gráfica 3. Diagrama obtenido al variar la concentración del NaNO₂.

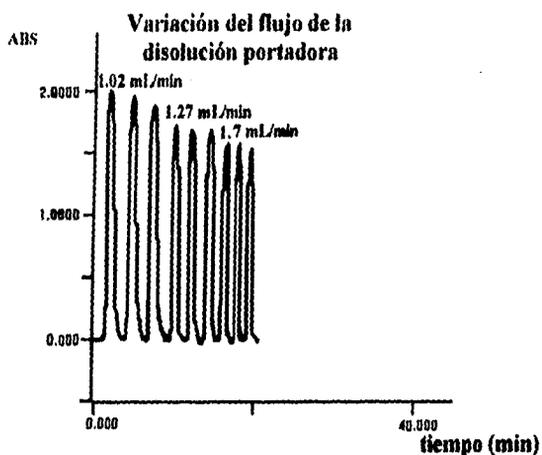
4.3.1.2 Flujo

El flujo se optimizó variando la velocidad de la bomba peristáltica, manteniendo constante el diametro de las mangueras. Cuando se disminuyó el flujo se observó un aumento en la absorbancia, en el ancho de las señales y en el tiempo de residencia.



Gráfica 4. Diagrama obtenido al variar la velocidad de la bomba peristáltica, manteniendo constantes las dimensiones de los tubos y mangueras del sistema.

Cuando todos los demás parámetros estuvieron optimizados, se volvió a llevar a cabo una optimización del flujo de la disolución portadora y se encontró que el mejor flujo para llevar a cabo el análisis es 1.7 mL/min, ya que el tiempo de análisis disminuye notablemente, y se llega a un buen equilibrio entre la dispersión obtenida y el progreso de la reacción entre el analito y los reactivos. En la gráfica 5 se muestra el diagrama obtenido bajo estas condiciones.



Gráfica 5. Diagrama obtenido al variar la velocidad de la bomba peristáltica después de haber optimizado los demás parámetros.

Con ese de la disolución portadora, el flujo de cada línea es:

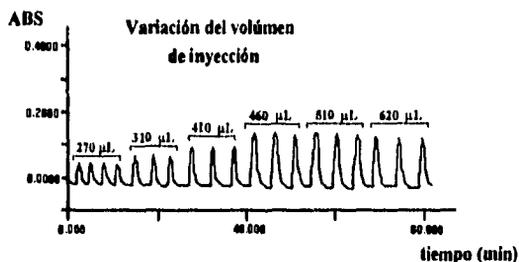
flujo de muestra (mL/min):	1.7
flujo de NaNO_2 (mL/min):	1.7
flujo de Sulfanilamida (mL/min):	0.875

Estos flujos no tienen ninguna influencia en la dispersión.

La optimización de los siguientes parámetros se llevó a cabo utilizando un flujo de la disolución portadora de 1.02 mL/min.

4.3.1.3 Volumen de Muestra

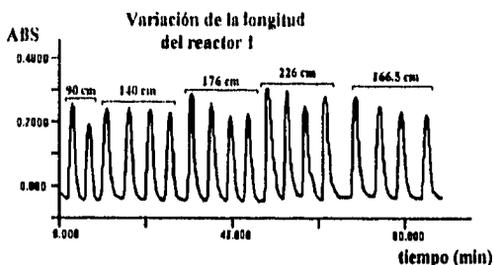
Para variar el volumen de muestra, se cambió el tamaño del rizo. Al inyectar 220 μL (100 μL correspondientes al rizo y 120 μL a la válvula de inyección) no se observó cambio en la línea base ni formación de una señal FIA. La absorbancia de las señales obtenidas al inyectar 270 y 320 μL es similar. En el intervalo de 320 μL a 460 μL se observó un aumento en la absorbancia al aumentar el volumen inyectado. Al aumentar la cantidad de muestra inyectada a volúmenes mayores de 460 μL se observó que la altura de la señal analítica se mantenía constante.



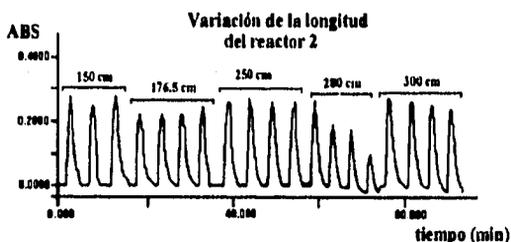
Gráfica 6. Diagramas obtenidos al variar el volumen de inyección.

4.3.1.4 Longitud de los Reactores

El diámetro interno de la tubería que se utilizó para elaborar los reactores tenía un diámetro interno de 0.5 mm. Al variar la longitud del reactor 1 se observó que la única longitud en la que los tamaños de los picos eran reproducibles fue 140 cm, por lo que se escogió como la óptima; lo mismo se pudo observar en el reactor 2 utilizando como longitud 250 cm, por lo que también se escogió como la óptima.



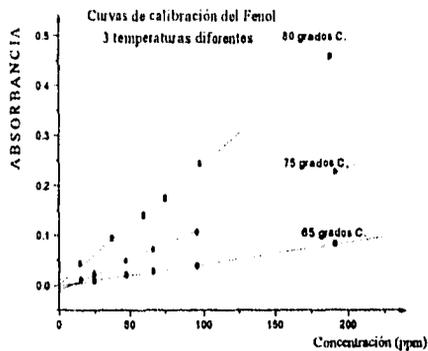
Gráfica 7. Diagramas obtenidos al variar la longitud del reactor 1.



Gráfica 8. Diagramas obtenidos al variar la longitud del reactor 2.

4.3.1.5 Temperatura

Al introducir los reactores a un baño termostataado se observó que la reacción de copulación se favorecía al aumentar la temperatura del baño. El intervalo de temperaturas estudiado fué de 18°C a 85°C. A temperaturas superiores a 80°C, existieron problemas de formación de burbujas provocado por dos fenómenos: 1. a la tendencia del grupo diazonio para separarse como una molécula de nitrógeno, llevándose consigo sus electrones de enlace, y 2. a la liberación de NO a partir del NaNO_2 en medios ácidos, acción que se ve favorecida por un ascenso en la temperatura. En la gráfica 9 se puede observar el aumento en la absorbancia al aumentar la temperatura del baño termostataado.



Gráfica 9. Curvas de calibración del fenol a diferentes temperaturas.

En la tabla 5 se muestran los valores óptimos y los intervalos estudiados de todas las variables.

Tabla 5. Condiciones Óptimas.

VARIABLE	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Concentración Sulfanilamida (%) (M)	0.025-0.6 1.45×10^{-3} -0.035	0.05 0.003
Concentración NaNO_2 (%) (M)	0.025-0.4 3.6×10^{-3} -0.058	0.4 0.058
Flujo de la disolución portadora (mL/min)	0.39-1.7	1.7
Volumen de muestra (μL)	220-620	460
Long. reactor 1 (cm)	90-266.5	140
Long. reactor 2 (cm)	150-300	250
Temperatura	18°C-85°C	80°C

4.3.2 Discusión de Resultados

No se cuenta con una explicación satisfactoria al problema de la falta de reproducibilidad cuando se utiliza un reactor 1 con una longitud de 140 cm o cuando se utiliza un reactor 2 con una longitud de 250 cm, así como cuando se utiliza sulfanilamida a concentraciones superiores a 0.5% p/v.

A pesar de que se observa una tendencia a aumentar la absorbancia al aumentar la concentración de NaNO_2 , no es posible utilizar concentraciones superiores a 0.4% p/v ya que el problema de formación de burbujas de NO debidas a la dismutación del ácido nitroso, no se puede superar dentro del sistema en flujo.

Uno de los factores que afectan a la dispersión es el flujo; como ya se había mencionado, (página 50), al aumentar el flujo disminuye la dispersión, sin embargo en la configuración desarrollada ocurre lo contrario, ya que al aumentar el flujo disminuye la altura y por lo tanto aumenta la dispersión. Esto se puede deber a que tal vez la cinética de la reacción es lenta, lo que puede ocasionar que sea necesario dar más tiempo a la reacción para que se lleve a cabo, disminuyendo la absorbancia al aumentar el flujo.

Esta razón también podría explicar el porqué ya no hay cambio en la absorbancia al inyectar volúmenes de muestra superiores a 460 μL ; tal vez se necesita más tiempo para que una mayor proporción de la muestra se transforme al azo-compuesto.

Se confirmó que a mayor longitud de los reactores, existe un aumento en la difusión, como se había discutido previamente, (página 49).

Al aumentar la temperatura del baño termostataado se observó un aumento en la absorbancia. Se escogió como temperatura óptima para llevar a cabo el análisis 80°C, ya que a pesar de que la curva de calibración realizada a

esa temperatura no tiene el mejor coeficiente de correlación, si es la que tiene el mejor coeficiente de absorptividad.

En un minuto ingresan al sistema 2.55×10^{-3} mmoles de sulfanilamida, 9.28×10^{-2} mmoles de nitrito de sodio, por lo que al parecer debe haber un exceso de nitrito de sodio. De estas cantidades de reactivos no es posible saber cuanto reacciona de cada uno de los reactivos dentro del sistema en flujo.

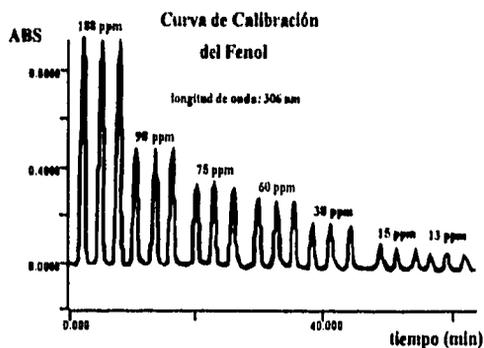
4.4. Determinación del Fenol.

Se realizó el estudio de la cantidad mínima detectable, de la cantidad mínima medible y del intervalo de linealidad utilizando como muestra soluciones de fenol, en el sistema FIA optimizado.

Por cantidad mínima medible se entiende la concentración más pequeña que entra al intervalo de linealidad y que, por lo tanto, se puede estimar utilizando la curva de calibración; además debe corresponder a por lo menos 10 veces la desviación estándar del ruido.

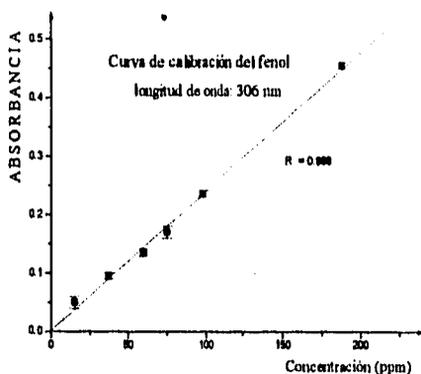
Por cantidad mínima detectable se entiende la concentración más pequeña que produce un pico FIA cuya altura es tres veces la desviación estándar del ruido y que no entra al intervalo de linealidad, por lo que no se puede estimar utilizando la curva de calibración.

A continuación se presenta el diagrama obtenido al realizar el estudio del intervalo de linealidad utilizando como muestra el fenol; los estándares se elaboraron partiendo de dos soluciones stock de fenol en medio alcalino, de concentraciones 9400 ppm y 1654 ppm respectivamente.



Gráfica 10. Diagrama de la curva de calibración del fenol dentro del sistema FIA optimizado.

En la curva de calibración la cantidad mínima detectable es 13 ppm tomándolo como tres veces la desviación estandar del ruido y la cantidad mínima medible es 15 ppm.



Gráfica 10. Curva de calibración del fenol

La curva de calibración sigue un comportamiento lineal. Si se considera una buena precisión a aquella que represente un coeficiente de variación ($CV=s/x$) menor al 10%, la precisión de esta curva es buena ya que todos los puntos tienen un coeficiente de variación menor al 10%, exceptuando los puntos correspondientes a una concentración de 15 ppm, cuyo CV es de 20%.

4.5. Determinación de varios fenoles sustituidos

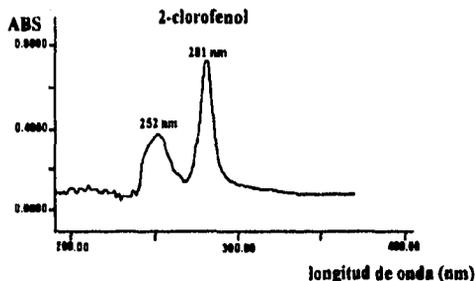
Los fenoles utilizados como muestras son:

- 2-clorofenol de la compañía Aldrich
- 2,4-diclorofenol de la compañía Aldrich
- 4-cloro-3-metil-fenol de la compañía Aldrich
- 2,4,5-triclorofenol de la compañía Aldrich
- pentaclorofenol de la compañía Aldrich
- 2-nitrofenol de la compañía Aldrich
- 4-nitrofenol de la compañía Aldrich
- 2,4-dinitrofenol de la compañía Sigma
- 4-aminofenol de la compañía Aldrich
- 2-fluorofenol de la compañía Aldrich
- pentafluorofenol de la compañía Aldrich

Se obtuvo el espectro de absorción de cada producto de reacción de los distintos fenoles y en el máximo de absorción se realizó una curva de calibración con las concentraciones correspondientes al intervalo lineal observado para el fenol. También se obtuvieron tres picos FIA en la longitud de onda de 306 nm, lo cual corresponde al máximo absorción presentado por el producto de reacción del fenol. Todas las concentraciones utilizadas corresponden a ppm de fenol. Cada estándar se inyectó por triplicado. En las curvas de calibración se graficó el promedio de las tres inyecciones junto con la desviación estándar. Todos los estándares se elaboraron partiendo de una solución stock en medio alcalino, utilizando por cada parte de fenol, una cuarta parte de hidróxido de sodio. Para realizar las diluciones se utilizaron micropipetas, para facilitar el manipuleo de soluciones y para evitar tener una gran cantidad de residuos.

a) 2-clorofenol

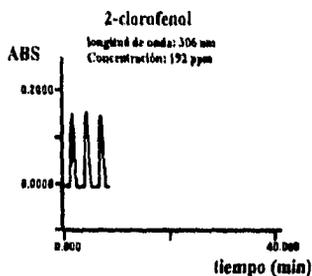
El espectro del producto de la reacción de copulación del 2-clorofenol con la sulfanilamida diazotizada presenta dos máximos de absorción provocados por dos transiciones energéticas diferentes, como se observa en la gráfica 11. La curva de calibración se realizó en 281 nm.



Gráfica 11. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 2-clorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

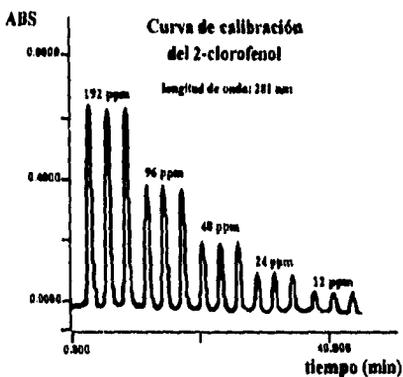
La presencia de un sustituyente -Cl, el cual es auxocrómico debido a su capacidad de tener una absorción electrónica, en la posición *orto* del anillo provoca el desplazamiento hipsocrómico de la longitud de máxima absorción de 306 nm, hasta 281 nm, así como un efecto hiperocrómico en la señal.

Como se observa en la gráfica 12, en 306 nm el cloro ejerce un efecto hipocrómico, ya que la intensidad observada es menos de la mitad de la observada por el fenol a una concentración similar, por lo que si se realizara una curva de calibración en la longitud de onda de 306 nm, el coeficiente de absortividad sería menor que el presentado por la curva de calibración del fenol.



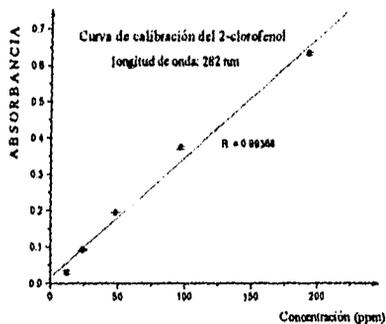
Gráfica 12. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-clorofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock de 2-clorofenol con una concentración de 1924 ppm de fenol.



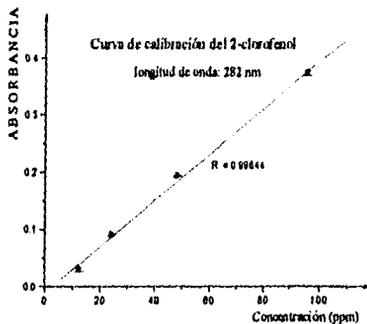
Gráfica 13. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-clorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

Como se muestra en la gráfica 14, existe una relación lineal entre la concentración y la absorbancia, aunque se puede apreciar que las concentraciones cercanas a las 200 ppm salen un poco de esta relación.



Gráfica 14. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-clorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

El intervalo lineal va de 12 ppm hasta 96 ppm, ya que en esta región el coeficiente de correlación es mejor (0.99844).

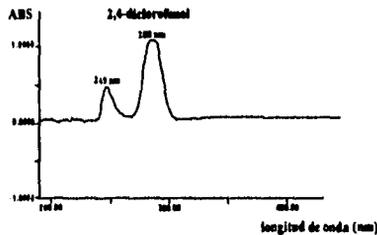


Gráfica 15. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-clorofenol y la sulfanilamida diazotizada en el intervalo de 12 a 96 ppm.

Si se considera una buena precisión a aquella que represente un coeficiente de variación ($CV=s/x$) menor al 10%, la precisión de estas curvas es muy buena ya que todos los puntos tienen un coeficiente de variación menor al 5%, exceptuando los puntos correspondientes a una concentración de 12 ppm, cuyo CV es de 11.21%.

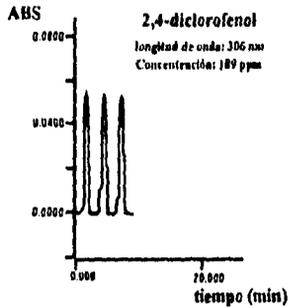
b) 2,4-diclorofenol

El espectro de absorción del compuesto formado por la reacción del 2,4-diclorofenol y la sal de diazonio presenta dos máximos, muy cercanos al presentado por el 2-clorofenol (gráfica 16). La curva de calibración se realizó en 288nm.



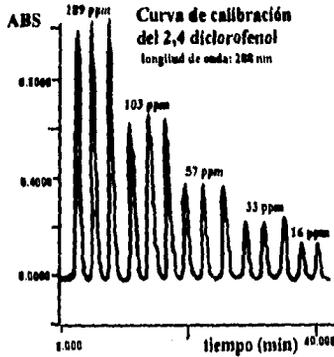
Gráfica 16. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 2,4-diclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La absorbancia de las tres inyecciones a una longitud de onda de 306 nm es mucho menor a la presentada por el fenol, es decir, se presenta un efecto hipocrómico como se muestra en la gráfica 17. Si se realizara una curva de calibración en 306 nm, el coeficiente de absorptividad sería mucho menor, que el presentado por la curva de calibración del fenol.



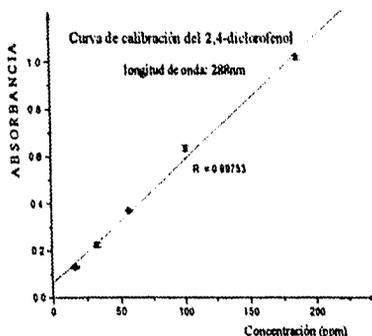
Gráfica 17. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-diclorofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock de 2,4-diclorofenol con una concentración de 2051 ppm de fenol.



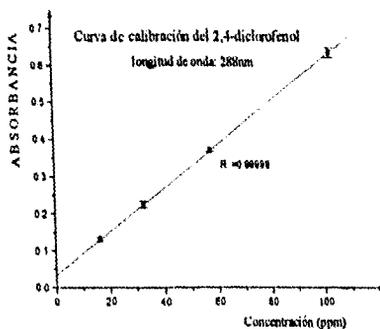
Gráfica 18. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-diclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La curva de calibración tiene un comportamiento lineal, como se observa en la gráfica 19, aunque se puede apreciar que la concentración de 189 ppm sale un poco del intervalo de linealidad.



Gráfica 19. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-diclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La linealidad en el intervalo de 16 a 103 ppm es excelente, ya que el coeficiente de correlación es de 0.99999.

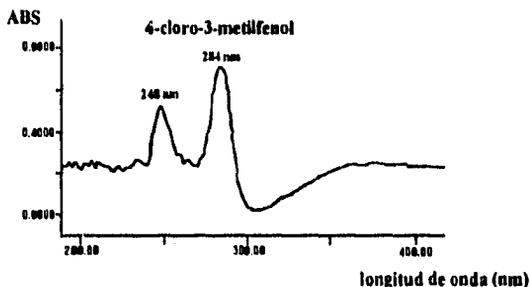


Gráfica 20. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-diclorofenol y la sulfanilamida diazotizada, en el intervalo de 16 a 103 ppm.

La precisión de todas las inyecciones es muy buena, ya que todas tienen un coeficiente de variación menor al 5%.

c) 4-cloro-3-metil-fenol

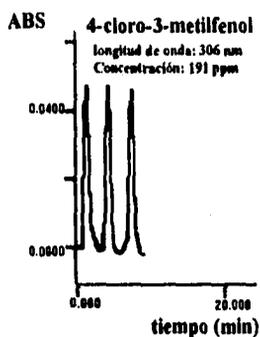
El espectro del producto de la reacción de copulación entre la sulfanilamida diazotizada y el 4-cloro-3-metil fenol presenta dos máximos debidos a dos transiciones energéticas diferentes, y muy similares a los presentados por los dos compuestos fenólicos anteriores, como se muestra en la gráfica 21. La curva de calibración se realizó en 284 nm.



Gráfica 21. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 4-cloro-3-metilfenol y la sulfanilamida diazotizada.

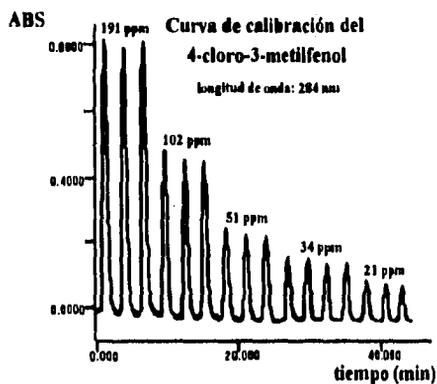
La absorbancia observada en las tres inyecciones realizadas a una longitud de onda de 306 nm es muy similar a la presentada por el azo compuesto formado con 2,4 diclorofenol y mucho menor a la presentada por el fenol en una concentración similar; es decir, la presencia de un cloro y un metilo provoca un efecto hipocrómico a 306 nm. Si se realizara una curva de calibración en la longitud de onda de 306 nm, el

coeficiente de absorptividad sería menor al de la curva de calibración del producto de reacción del fenol.



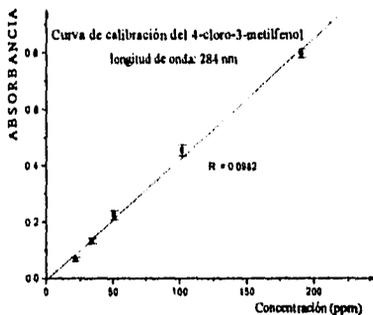
Gráfica 22. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-cloro-3-metilfenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 2120 ppm de fenol.



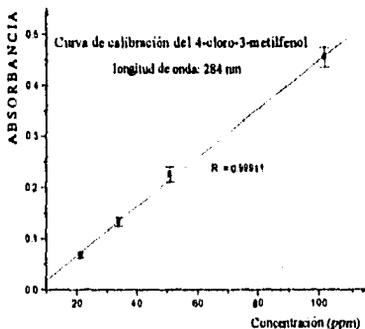
Gráfica 23. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-cloro-3-metilfenol y la sulfanilamida diazotizada.

La concentración y la absorbancia siguen un comportamiento lineal.



Gráfica 24. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-cloro-3-metilfenol y la sulfanilamida diazotizada.

La concentración de 191 ppm sale un poco del intervalo lineal, ya que en el intervalo de 21 a 102 ppm se tiene un buen coeficiente de correlación (0.9991).

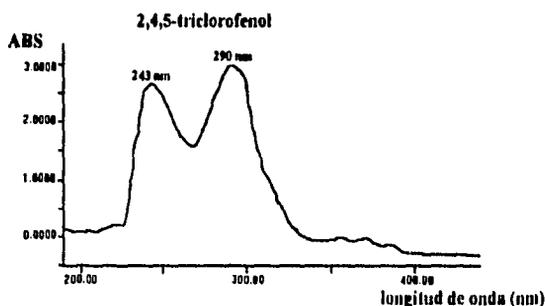


Gráfica 25. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-cloro-3-metilfenol y la sulfanilamida diazotizada en el intervalo de 21 a 102 ppm.

La precisión de las inyecciones en la curva de calibración es buena, ya que todas tienen un coeficiente de variación menor al 10%.

d) 2,4,5 tricolorofenol

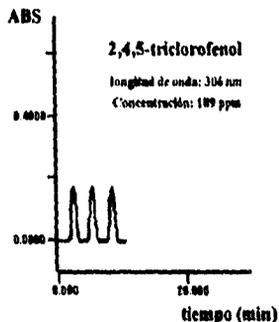
El producto de la reacción de copulación con el 2,4,5 tricolorofenol presenta dos máximos de absorción muy similares a los presentados por todos los clorofenoles anteriormente estudiados, como se muestra en la gráfica 26. La curva de calibración se realizó en 290 nm.



Gráfica 26. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 2,4,5-triclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

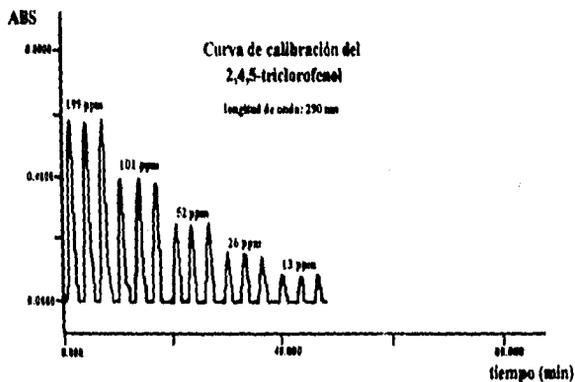
La absorbancia de las tres inyecciones realizadas a una longitud de onda de 306 nm es muy parecida a la presentada por el 2-clorofenol. Debido a que la absorbancia es mucho menor a la presentada por el producto de reacción del fenol, se puede esperar que si se realizara una curva de calibración en esta longitud de onda, la recta tendría un menor coeficiente de absorción que el presentado por la curva de

calibración del fenol, es decir, la presencia de tres sustituyentes auxocrómicos, provoca un efecto hipocrómico a 306 nm.



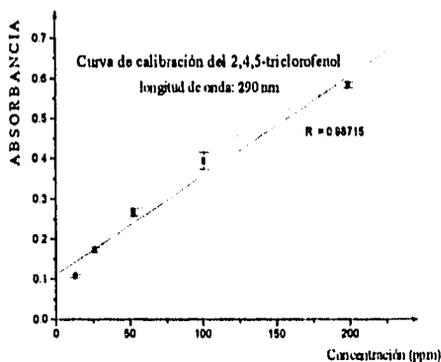
Gráfica 27. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4,5-triclorofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 1094 ppm de fenol.



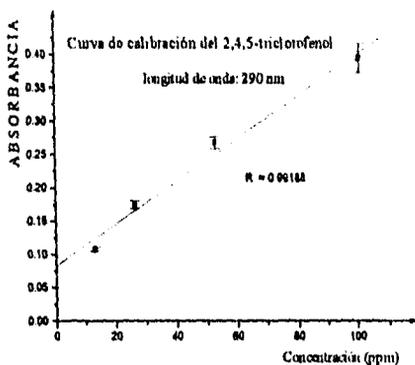
Gráfica 28. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4,5-triclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La curva de calibración no presenta un comportamiento lineal, ya que al parecer sigue un comportamiento logarítmico, aunque se puede pensar que a concentraciones mayores, la proporción de azo-compuesto formado es menor en comparación a cuando se utiliza 2,4,5-triclorofenol a concentraciones menores, ya que se trata de un compuesto con un gran impedimento estérico.



Gráfica 29. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4,5-triclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

En el intervalo comprendido entre 13 y 101 ppm existe linealidad y se presenta un mejor coeficiente de correlación (0.99188) en relación al intervalo comprendido entre 13 y 199 ppm.

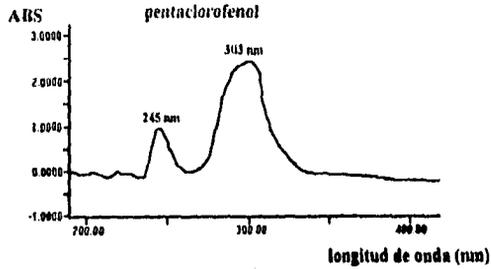


Gráfica 30. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4,5-triclorofenol y la sulfanilamida diazotizada, en el intervalo de 13 a 101 ppm.

La precisión de todas las inyecciones de la curva de calibración es buena, ya que todas presentan un coeficiente de variación menor al 10%.

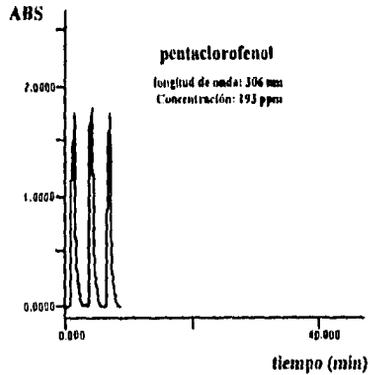
e) pentaclorofenol

El espectro de absorción obtenido al utilizar como muestra pentaclorofenol presenta dos máximos de absorción debidos a dos transiciones diferentes, como se muestra en la gráfica 31. La curva de calibración se realizó en 303nm.



Gráfica 31. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el pentaclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

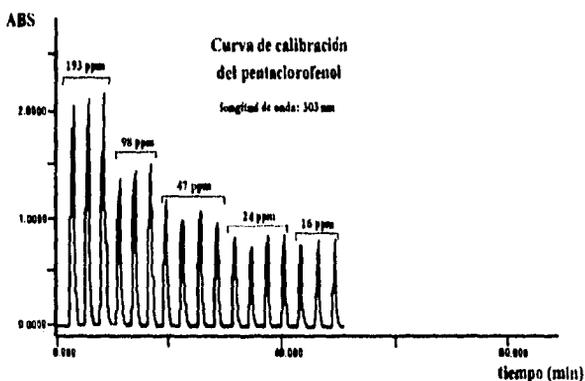
La presencia de 5 sustituyentes auxocrómicos en el fenol provoca un efecto hiperocrómico a una longitud de onda de 306 nm, ya que la intensidad de las señales FIA es mucho mayor a la presentada por el producto de reacción del fenol a la misma concentración. Si se trazara una curva de calibración en esta longitud de onda, el coeficiente de correlación sería mucho mayor al presentado por la curva del fenol.



Gráfica 32. Fíograma del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del pentaclorofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

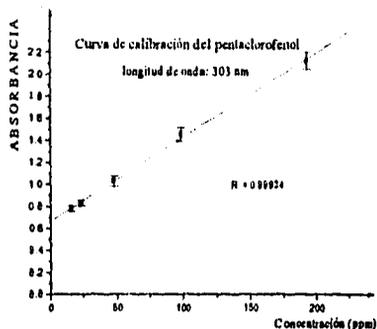
Todas las posiciones del anillo bencénico se encuentran ocupadas por sustituyentes, por lo que aunque se puede esperar que no ocurra la reacción de copulación, ésta si se lleva a cabo. No se puede predecir con certeza en que posición se efectúa la sustitución aunque se puede esperar que ocurra en las posiciones *orto* y *para* con respecto al grupo hidroxilo, ocurriendo la sustitución del cloro.

La curva de calibración se llevó a cabo utilizando estándares elaborados a partir de una disolución stock de pentaclorofenol con una concentración de 1967 ppm de fenol.



Gráfica 33. Flagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del pentaclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La curva de calibración tiene un comportamiento lineal, además de que tiene un buen coeficiente de correlación (0.99934).

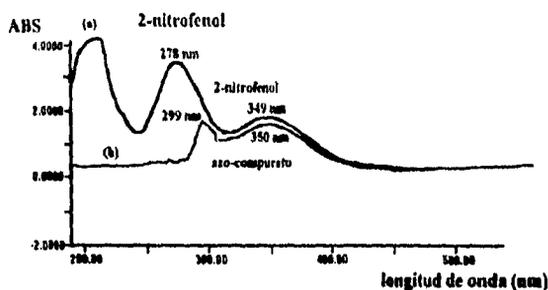


Gráfica 34. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del pentaclorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

Existe una buena precisión en todas las inyecciones ya que todas presentan un coeficiente de variación menor al 10%.

f) 2-nitrofenol

El 2-nitrofenol absorbe en la misma región del Ultravioleta que el azo-compuesto que se forma cuando reacciona con la sulfanilamida diazotizada. Debido a lo anterior, se obtuvo el espectro del azo-compuesto y del 2-nitrofenol en el sistema en flujo con la finalidad de comparar las longitudes de máxima absorción presentadas en ambos casos. Se inyectó como muestra una solución de 2-nitrofenol de 188 ppm al sistema en flujo, el cual contenía: a) agua destilada en lugar de los reactivos y b) NaNO_2 0.4% p/v en ácido acético al 30% v/v y Sulfanilamida 0.5% p/v en ácido acético al 30% v/v. Una vez que el bolo llegó a la celda, se detuvo la bomba peristáltica y se obtuvo el espectro de absorción.

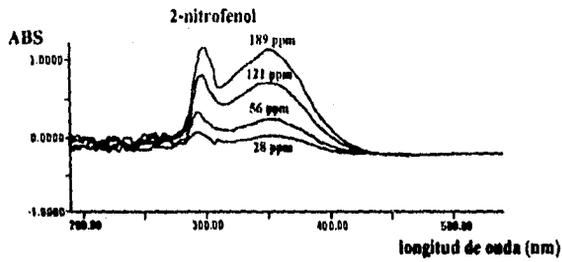


Gráfica 35. (a) Espectro de absorción del 2-nitrofenol utilizando agua destilada en el sistema FIA.

(b) Espectro de absorción del azo-compuesto formado a partir de la reacción de copulación del 2-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada.

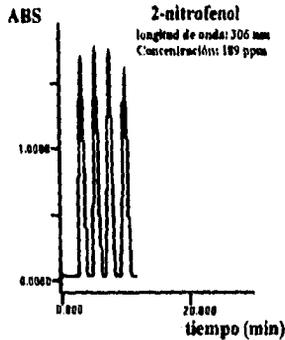
Uno de los máximos del azo-compuesto localizado en 350 nm, se superpone totalmente con una de las bandas del 2-nitrofenol por lo que no se puede llevar a cabo su cuantificación en esta longitud de máxima absorción. Existe otra λ_{max} , localizada en 299 nm, en la que se puede llevar a cabo la curva de calibración, aunque se va a tener la contribución del 2-nitrofenol que no haya reaccionado con la sulfanilamida diazotizada. En la λ_{max} localizada en 278 nm se puede cuantificar el 2-nitrofenol, ya que en esta longitud de onda no hay contribución del azo-compuesto.

Se obtuvo el espectro del azo-compuesto para diferentes concentraciones de 2-nitrofenol y se observó un aumento en la absorbancia de la señal al aumentar la concentración por lo que se concluyó que si es posible llevar a cabo la curva de calibración a una λ de 299nm.



Gráfica 36. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con la sulfanilamida diazotizada y el 2-nitrofenol a diferentes concentraciones.

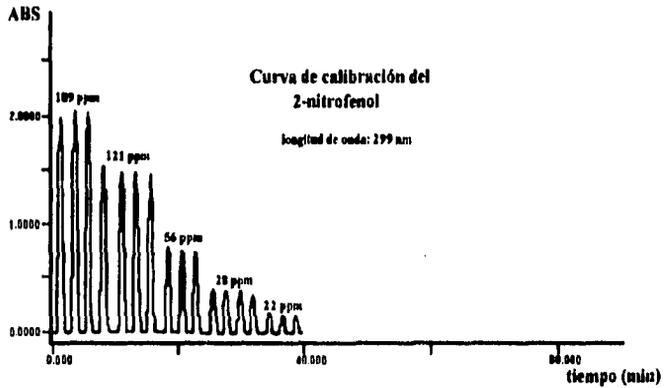
La absorbancia de las 4 inyecciones realizadas a una longitud de onda de 306 nm es mucho mayor a la que presenta el azo-compuesto formado por la reacción de copulación del fenol con la sulfanilamida diazotizada, es decir, se presenta un efecto hipercrómico por la presencia del grupo nitro en el anillo fenólico. Si se realizara una curva de calibración en esta longitud de onda, el coeficiente de absortividad sería mucho mayor al presentado por la curva del fenol.



Gráfica 37. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

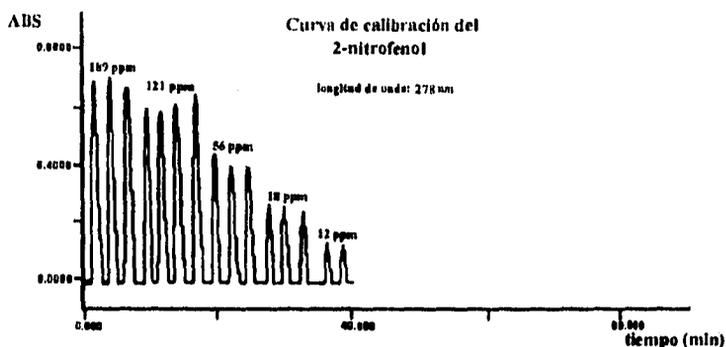
Se realizaron curvas de calibración en 299 nm y en 278 nm, utilizando las mismas concentraciones.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 2011 ppm de fenol.



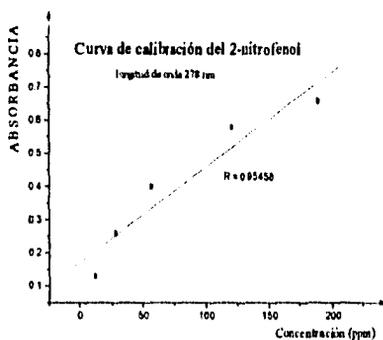
Gráfica 38. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada a una λ_{max} de 299 nm.

En este diagrama se detecta el azo-compuesto mientras en el que se presenta en la gráfica 39 se detecta el 2-nitrofenol que no reaccionó con la sal de diazonio, ya que en esta longitud de onda no hay contribución del azo-compuesto.



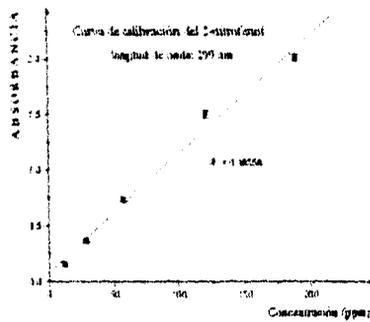
Gráfica 39. Diagrama del 2-nitrofenol que no reaccionó con la sal de diazonio en el sistema en flujo.

La curva de calibración realizada a 278 nm no sigue un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.



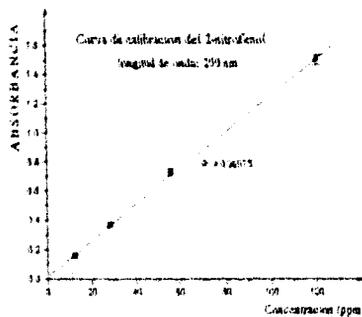
Gráfica 40. Curva de calibración del 2-nitrofenol que no reaccionó con la sal de diazonio en el sistema en flujo.

La curva de calibración realizada en 299 nm sigue un comportamiento lineal, aunque se puede advertir que la concentración de 189 ppm se sale del intervalo lineal.



Gráfica 41. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada a una λ_{max} de 299 nm.

El intervalo de linealidad que va desde 12 hasta 121 ppm tiene un mejor coeficiente de correlación (0.99975).



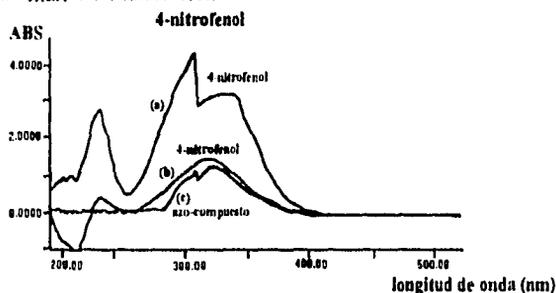
Gráfica 42. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada a una λ_{max} de 299 nm, correspondiente al intervalo de concentraciones de 12 a 121 ppm.

La precisión de las inyecciones de la curva de calibración es buena ya que todos los puntos presentan un coeficiente de variación menor al 10%.

g) 4-nitrofenol

Al igual que el 2-nitrofenol, el 4-nitrofenol también absorbe en la misma región del Ultravioleta que el azo compuesto. Se realizó el mismo procedimiento al realizado con el 2-nitrofenol (página 99). Se obtuvo el espectro de absorción del 4-nitrofenol dentro del sistema en flujo inyectando 4-nitrofenol a una concentración de 192 ppm, pero como se observó que existía saturación del detector, se inyectó también una solución del compuesto a una concentración de 47 ppm. Así mismo se obtuvo el espectro de absorción del azo-compuesto inyectando 4-nitrofenol a una concentración de 47 ppm.

La longitud de máxima absorción del azo-compuesto se encuentra en la misma zona que la λ_{max} del 4-nitrofenol.

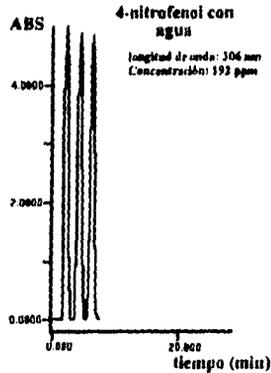


Gráfica 43. (a) Espectro de absorción del 4-nitrofenol a una concentración de 192 ppm.

(b) Espectro de absorción del 4-nitrofenol a una concentración de 47 ppm.

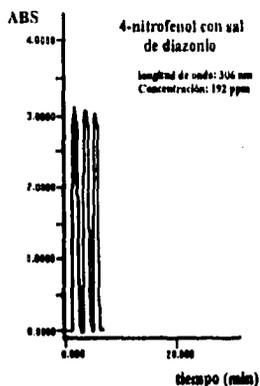
(c) Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 4-nitrofenol (47 ppm) y la sulfanilamida diazotizada.

La intensidad de las señales del 4-nitrofenol en el sistema FIA utilizando agua destilada en lugar de los reactivos, es superior a la del azo-compuesto. Sin embargo, ambas son más intensas que la presentada por el producto de la reacción de copulación con el fenol. En 306 nm, tenemos contribución del azo-compuesto y del 4-nitrofenol que no reaccionó, ya que la absorbancia total es debida a la suma de las absorbancias individuales.



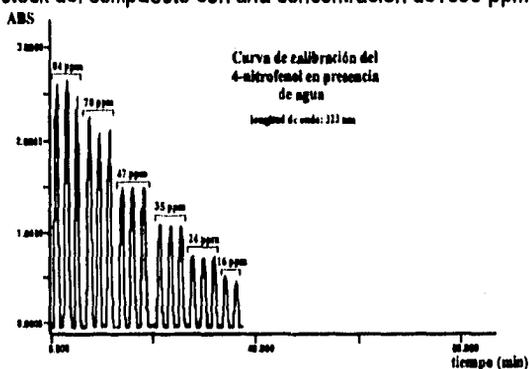
Gráfica 44. Diagrama del 4-nitrofenol dentro del sistema en flujo a una longitud de onda de 306 nm.

Si se trazara una curva de calibración en esta longitud de onda, el coeficiente de absorptividad sería mayor al presentado por la curva de calibración del azo-compuesto formado con el fenol y la sal de diazonio.

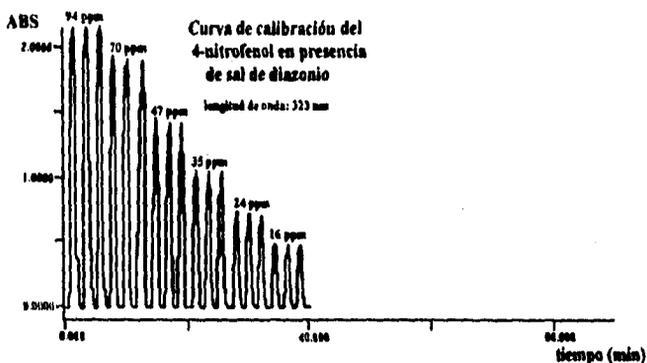


Gráfica 45. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Se realizaron curvas de calibración a la misma longitud de onda utilizando agua destilada dentro del sistema FIA y utilizando los reactivos con la finalidad de formar el azo-compuesto. Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 1959 ppm de fenol.

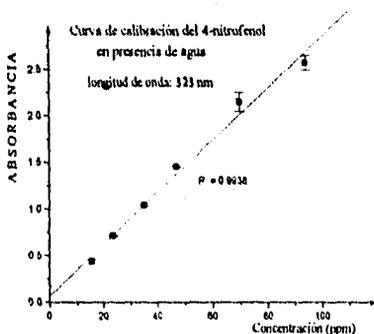


Gráfica 46. Diagrama de la curva de calibración del 4-nitrofenol en presencia de agua destilada dentro del sistema FIA.



Gráfica 47. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La curva de calibración obtenida al inyectar el compuesto dentro del sistema FIA utilizando agua destilada sigue un comportamiento lineal con un buen coeficiente de correlación, aunque al parecer la concentración de 94 ppm sale del intervalo lineal.



Gráfica 48. Curva de calibración del 4-nitrofenol en presencia de agua destilada dentro del sistema FIA.

El intervalo lineal comprendido entre las concentraciones que van desde 10 hasta 70 ppm, tiene un mejor coeficiente de correlación (0.99972)

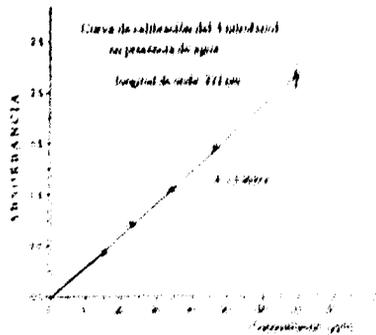
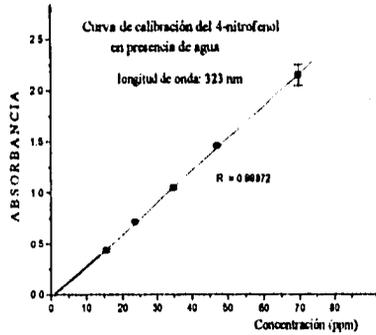


Gráfico 48. Curva de calibración del Nitrato de plata en presencia de agua en presencia de agua en el sistema FA, en el intervalo comprendido entre 10 hasta 70 ppm.

Se presenta una buena precisión en todos los puntos que se usaron en la curva de calibración y que todos tienen un coeficiente de correlación mayor a 0.999 en todas las concentraciones superiores a 20 ppm. Mejor una buena precisión que en las concentraciones comprendidas entre 10 y 20 ppm.

En la curva de calibración de azobenzopiridina se observó que a pesar de tener una buena proporción de azobenzopiridina en el sistema FA, se observó que a las concentraciones menores de 40 ppm.

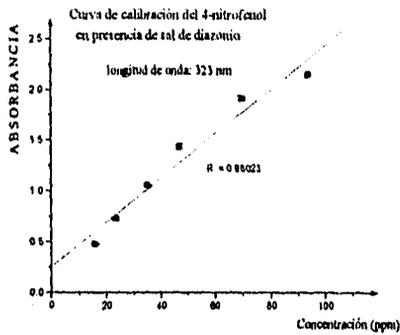
El intervalo lineal comprendido entre las concentraciones que van desde 16 hasta 70 ppm, tiene un mejor coeficiente de correlación (0.99972).



Gráfica 49. Curva de calibración del 4-nitrofenol en presencia de agua destilada dentro del sistema FIA, en el intervalo comprendido entre 16 hasta 70 ppm.

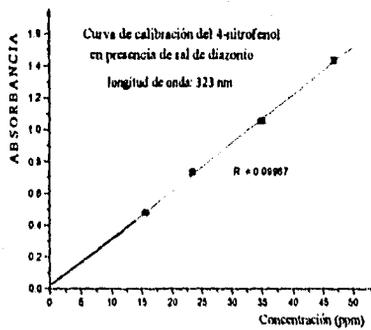
Se presenta una buena precisión en todos los puntos que integran la curva de calibración ya que todos tienen un coeficiente de variación menor al 5%; sin embargo las concentraciones superiores a 70 ppm, tienen una menor precisión que las concentraciones comprendidas entre 16 y 47 ppm.

En la curva de calibración del azo-compuesto, se observa que al parecer existe una menor proporción de azo-compuesto formado a concentraciones mayores que a concentraciones menores de 4-nitrofenol.



Gráfica 50. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La linealidad en el intervalo comprendido entre 16 hasta 47 ppm, presenta un buen coeficiente de correlación (0.99967), como se observa en la gráfica 51.

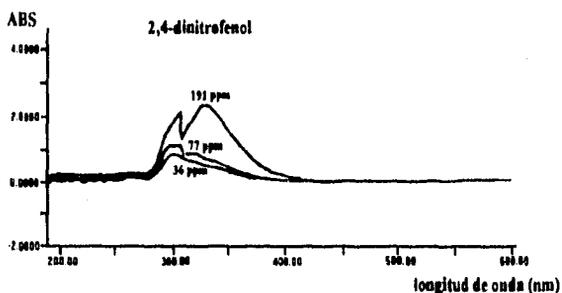


Gráfica 51. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-nitrofenol y la sulfanilamida diazotizada, en el intervalo de 16 hasta 47 ppm.

Todos los puntos que integran la curva de calibración tienen una muy buena precisión, ya que en todos los casos tienen un coeficiente de variación menor al 2%.

h) 2,4 dinitrofenol

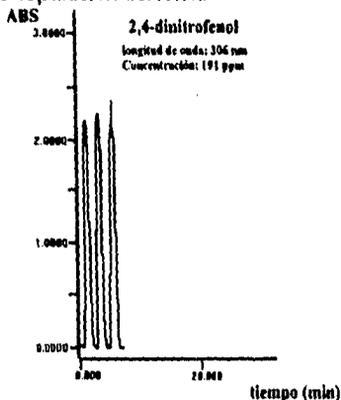
Se obtuvo el espectro de absorción del producto de la reacción del 2,4-dinitrofenol y la sulfanilamida diazotizada utilizando tres concentraciones diferentes del reactivo: (a) 191 ppm, (b) 77 ppm y (c) 36 ppm. Se presentan dos máximos de absorción, uno a una menor longitud de onda al presentado por el producto de la reacción de copulación con el fenol, y otro a una mayor longitud de onda. La curva de calibración se realizó en 302 nm.



Gráfica 52. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 2,4 dinitrofenol y la sulfanilamida diazotizada.

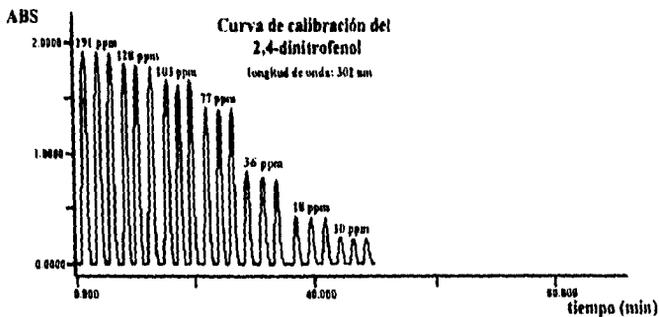
La presencia de dos sustituyentes auxocrómicos nitro en las posiciones 2 y 4 del anillo fenólico, provocan un efecto hipercrómico en 306 nm, ya que la intensidad de las señales es mucho mayor en comparación a la esperada para el producto de la reacción de copulación con el fenol. Si se realizara una curva de calibración a esta longitud de

onda, el coeficiente de absorptividad sería mucho mayor que el esperado para el producto de la reacción de copulación del fenol.



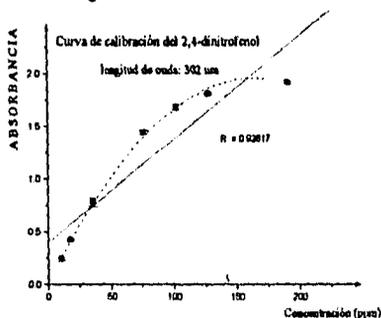
Gráfica 53. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-dinitrofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 1276 ppm de fenol.



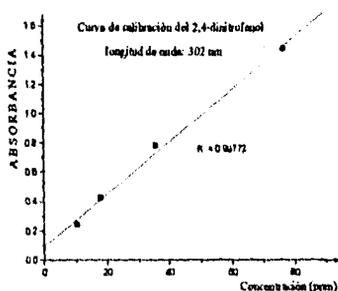
Gráfica 54. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-dinitrofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La curva de calibración con todas las concentraciones no sigue un comportamiento lineal; el coeficiente de correlación no es bueno ya que al parecer la curva sigue un comportamiento logarítmico.



Gráfica 55. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-dinitrofenol y la sulfanilamida diazotizada.

El intervalo lineal va desde 10 hasta 77 ppm, y presenta un buen coeficiente de correlación (0.99925). Las tres concentraciones superiores salen totalmente de este intervalo; al parecer a concentraciones superiores, hay una menor proporción de azo-compuesto formado que a menores concentraciones.

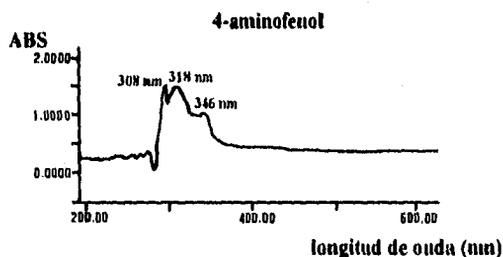


Gráfica 56. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2,4-dinitrofenol y la sulfanilamida diazotizada en el intervalo comprendido entre 10 y 77 ppm.

La precisión de todos los puntos que integran la curva de calibración es bastante buena ya todas las inyecciones presentan un coeficiente de variación menor al 5%.

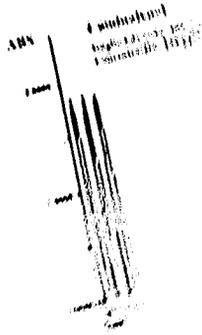
i) 4-aminofenol

El espectro del producto de la reacción de copulación de la sal de diazonio con el 4-aminofenol presenta tres máximos de absorción, todos a una mayor longitud de onda al presentado por el producto de reacción del fenol, por lo que la presencia de un sustituyente amino en la posición 4 del anillo fenólico provoca un efecto batocrómico.



Gráfica 57. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada.

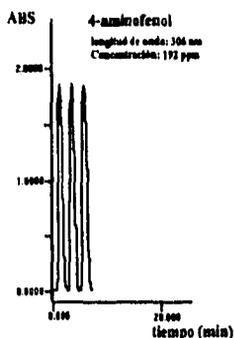
La absorbancia de las tres inyecciones realizadas a una longitud de onda de 306 nm tienen una mayor intensidad en comparación con la presentada por el producto de la reacción de copulación del fenol con la sulfanilamida diazotizada a la misma concentración. Si se realizara una curva de calibración del 4-aminofenol en esta longitud de onda, el coeficiente de absorptividad sería mucho mayor al presentado por la curva del fenol.



[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

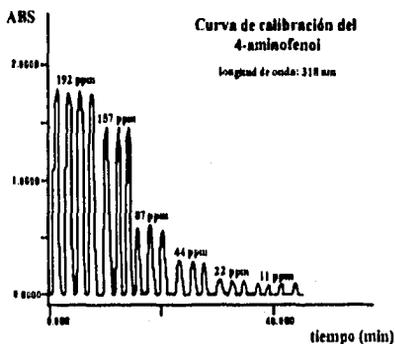
[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]



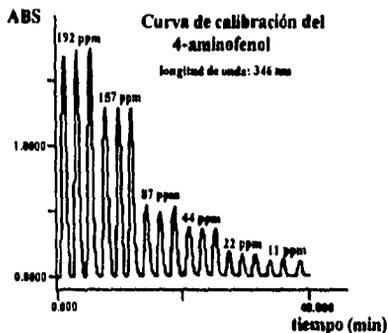
Gráfica 58. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

La curva de calibración realizada se leyó en 318 nm y en 346 nm y no en 308 nm porque es menor el ancho de banda en esta longitud de onda, traduciendo en una menor precisión de medida.



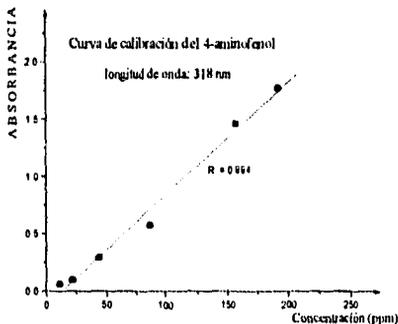
Gráfica 58. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto, obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a una λ_{max} de 318 nm.

Los estándares de la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 2184 ppm de fenol.

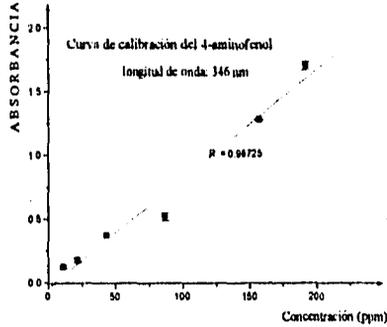


Gráfica 59. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a una λ_{max} de 346 nm.

Al parecer se presentan dos intervalos de linealidad con diferentes pendientes en ambas longitudes de onda, los cuales comprenden las siguientes concentraciones: a) de 11 a 44 ppm y b) de 87 a 192 ppm.



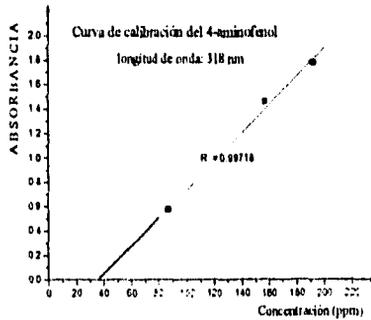
Gráfica 60. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a 318 nm.



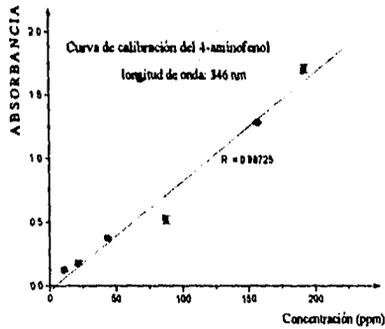
Gráfica 61. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a 346 nm.

En el intervalo de 87 a 192 ppm mejora notablemente el coeficiente de correlación para ambas longitudes de onda:

- De 0.98725 hasta 0.99961 en la curva leída en 346 nm, y
- De 0.994 hasta 0.99718 en 318 nm.



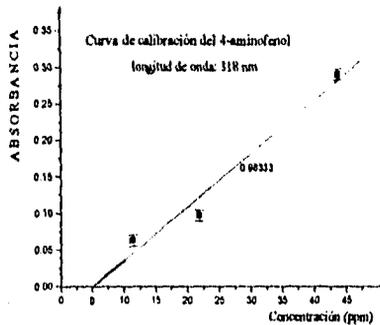
Gráfica 62. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a 318 nm en el intervalo de 87 a 192 ppm.



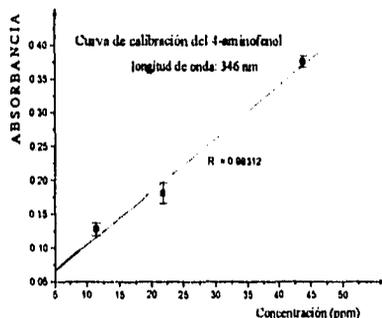
Gráfica 63. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a 346 nm en el intervalo de 87 a 192 ppm.

En el intervalo de 11 hasta 44 ppm, también mejora el coeficiente de correlación en 346 ppm, situación que no ocurre en 318 ppm.

- De 0.98725 hasta 0.99312 en la curva leída en 346 nm.
- De 0.994 a 0.98333 en la curva leída en 318 nm.



Gráfica 64. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a 318 nm en el intervalo de 11 a 44 ppm.



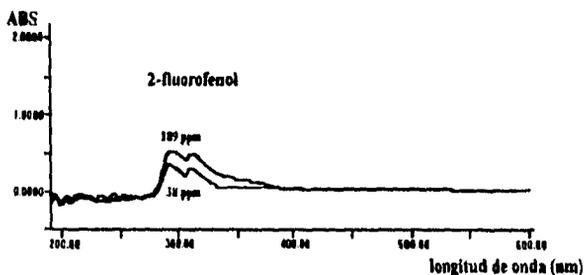
Gráfica 65. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 4-aminofenol y la sulfanilamida diazotizada a 346 nm en el intervalo de 11 a 44 ppm.

La precisión de todos los puntos que integran la curva de calibración leída en 346 nm es buena, ya que todos presentan un coeficiente de variación menor al 10%.

En 318 nm, la precisión de los puntos se puede definir en dos zonas, ya que en el intervalo de 87 hasta 192 ppm todos los puntos tienen un coeficiente de variación menor al 5%, mientras que el de algunos puntos del intervalo comprendido entre 11 y 44 ppm, es superior al 10%.

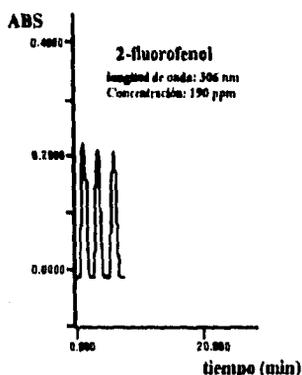
2-fluorofenol

Se inyectó como muestra 2-fluorofenol a una concentración de 189 ppm y de 38 ppm con la finalidad de obtener el espectro del producto de la reacción de copulación con la sulfanilamida diazotizada. Se presentan dos máximos de absorción, en 290 nm y en 310 nm respectivamente.



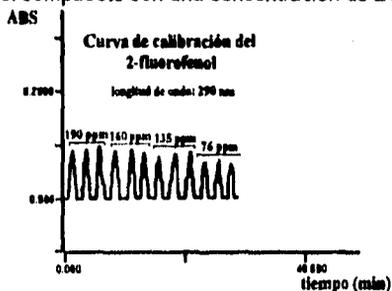
Gráfica 66. Espectro de absorción del azo-compuesto formado con el 2-fluorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La intensidad de las tres inyecciones realizadas en la longitud de onda de 306 nm es menor que las que presentaría el producto de la reacción de copulación con el fenol, es decir, la presencia de un sustituyente auxocrómico fluor en la posición 2 del anillo fenólico provoca un efecto hipocrómico. Si se realizara una curva de calibración en esta longitud de onda, el coeficiente de absortividad del producto de la reacción de copulación con el 2-fluorofenol, sería menor que el presentado por la curva del fenol.



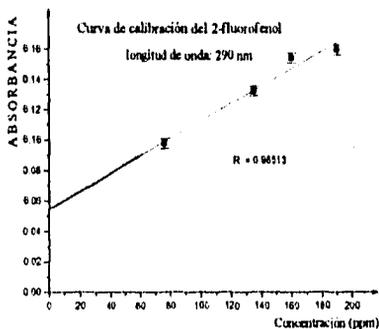
Gráfica 67. Diagrama del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-fluorofenol y la sulfanilamida diazotizada a una longitud de onda de 306 nm.

Los estándares utilizados en la curva de calibración se elaboraron a partir de una disolución stock del compuesto con una concentración de 2109 ppm de fenol.



Gráfica 68. Diagrama de la curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-fluorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La curva de calibración no presenta un buen coeficiente de correlación, además de que el coeficiente de absortividad es pequeño. Al parecer se trata de dos intervalos de linealidad diferentes, con pendientes también diferentes, aunque esto no se puede asegurar debido a que se utilizaron pocos estándares, ya que aquellos con menor concentración no provocaron señal analítica.



Gráfica 69. Curva de calibración del azo-compuesto obtenido a partir de la reacción del 2-fluorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

La precisión de todos los puntos presentes en la curva de calibración es buena, ya que todos presentan un coeficiente de variación menor al 5%.

k) pentafluorofenol

Este compuesto tiene ocupadas todas las posiciones donde se podría llevar a cabo la sustitución, por lo que al parecer no participa en la reacción de copuación.

No se obtuvo ninguna señal cuando se intentó obtener el espectro de absorción utilizando a este compuesto como muestra, ni cuando se inyectó una concentración 190 ppm y se intentó leer en 306 nm.

4.6. Discusión de Resultados

Las transiciones energéticas que se llevan a cabo en los productos la reacción de copulación de todos los fenoles estudiados con la sal de diazonio son en orden de menor a mayor energía:

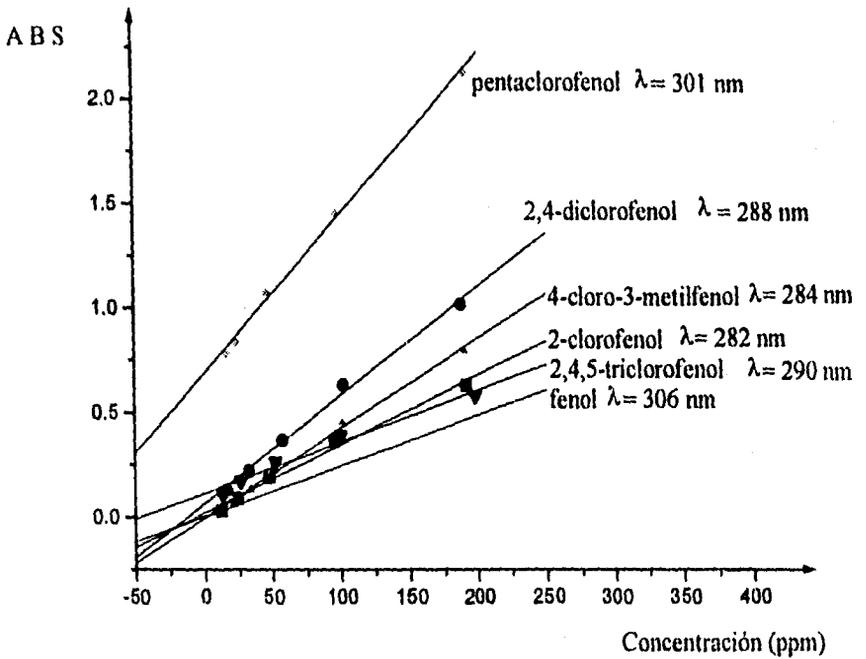


Cabe mencionar que la transición de $n \rightarrow \sigma^*$ no se observa en el Ultravioleta cercano, solo en el lejano.

4.6.1. Clorofenoles

Los productos de la reacción de copulación de los distintos clorofenoles con la sal de diazonio, tienen un mayor coeficiente de absortividad en su longitud de máxima absorción, en comparación con el que presenta el producto de la reacción de copulación del fenol, por lo que la presencia de sustituyentes cloro, los cuales son auxocrómicos, tienen un efecto hipercrómico. También ejercen un efecto hipsocrómico., es decir, provocan que se necesite más energía para llevar a cabo la transición energética, por lo que, ocurre lo contrario a lo que se esperaría ya que la sustitución con grupos auxococrómicos generalmente provoca un efecto batocrómico ya que tienen la capacidad de compartir un par de electrones libres con el anillo fenólico, favoreciendo las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. Los productos de la reacción de copulación de los distintos clorofenoles tienen una menor absorbancia a 306 nm, que la presentada por el azo-compuesto formado con el fenol, a excepción del pentaclorofenol. Debido a esto,

la cuantificación de fenol a 306 nm se debe realizar tomando en cuenta que puede existir contribución de clorofenoles presentes, por lo que el estudio no sería muy exacto.



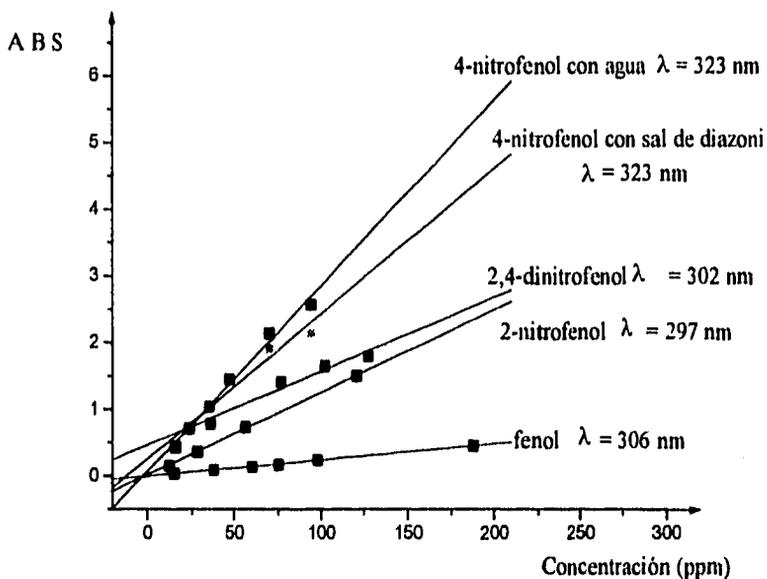
Gráfica 70. Comparación del coeficiente de absorptividad en la longitud máxima de absorción de los azo-compuestos formados con el fenol y con los clorofenoles estudiados.

4.6.2. Nitrofenoles

Todos los azo-compuestos formados por la reacción de copulación de los nitrofenoles utilizados tienen un mayor coeficiente de absorptividad al presentado por el producto de la reacción de copulación del fenol en su longitud de máxima absorción, así como en 306 nm, es decir, la presencia de un grupo cromóforo en el anillo fenólico, tiene un efecto hipercrómico.

La presencia de sustituyentes nitro puede provocar un efecto hipsocrómico o un batocrómico dependiendo de la posición en la que se encuentre el sustituyente cromóforo.

En el caso del 4-nitrofenol, el grupo cromóforo se encuentra en posición *para* con respecto al -OH auxocrómico, lo cual provoca un fuerte efecto batocrómico en su longitud de máxima absorción. Cuando el grupo cromóforo se encuentra en posición *orto* con respecto al grupo auxocrómico, la influencia no es tan marcada, como se observa en el caso del 2-nitrofenol. En el azo-compuesto formado con la sulfanilamida diazotizada y este compuesto existe un efecto hipsocrómico de sólo 9 unidades con respecto al máximo presentado por el producto de la reacción de copulación del fenol. Cuando se presentan dos grupos cromóforos en el anillo, uno en posición *para* y otro en posición *orto* con respecto al -OH auxocrómico, existe un pequeño efecto hipsocrómico de sólo 4 unidades. Todo lo anterior nos lleva a la conclusión de que es posible la cuantificación de los nitrofenoles con este método, utilizando la longitud de máxima absorción del fenol; sin embargo, se debe tomar en cuenta que también se tiene una fuerte contribución por parte de los nitrofenoles que no reaccionan con la sulfanilamida diazotizada.

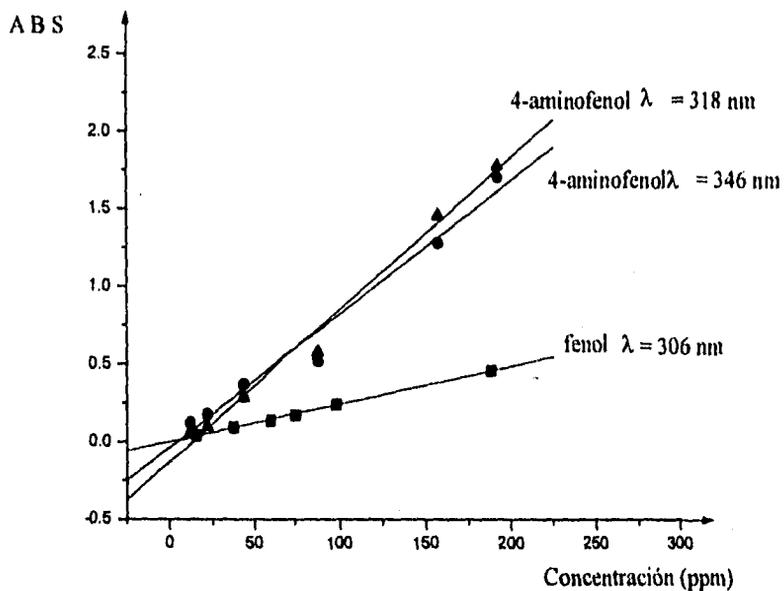


Gráfica 71. Comparación del coeficiente de absorptividad en la longitud máxima de absorción de los azo-compuestos formados con el fenol y con los nitrofenoles estudiados.

4.6.3. Aminofenol

El producto de reacción del 4-aminofenol presenta un mayor coeficiente de absorptividad que el azo-compuesto formado con el fenol, es decir, se presenta un efecto hipercrómico. El grupo amino es un activante fuerte por lo que la reacción de copulación con la sal de diazonio se vió favorecida, además de que por ser auxocrómico, puede donar un par de electrones libres al anillo, favoreciendo de esta

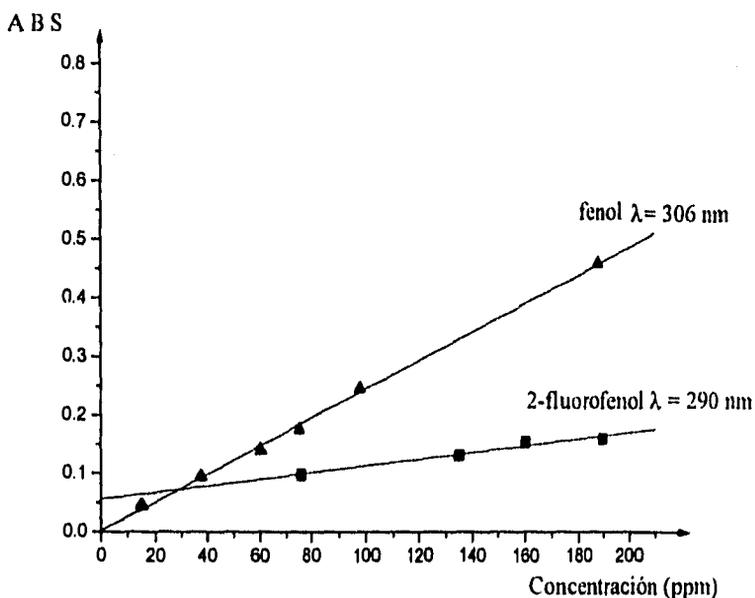
manera las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$. De este modo la presencia de un sustituyente amino en posición para con respecto al hidroxilo provoca un efecto batocrómico en la longitud máxima de absorción.



Gráfica 72. Comparación del coeficiente de absorptividad en la longitud máxima de absorción de los azo-compuestos formados con el fenol y el 4-aminofenol.

4.6.4. Fluorofenol

El único sustituyente que provoca una menor absorción del azo-compuesto, o que disminuye notablemente la formación de éste, es el fluor. La curva de calibración del azo-compuesto formado a partir de la reacción del 2-fluorofenol con la sulfanilamida diazotizada tiene un menor coeficiente de absorptividad que el del fenol. La presencia de un sustituyente fluor en la posición 2 del anillo fenólico, provoca un efecto hipsocrómico en la longitud máxima de absorción.

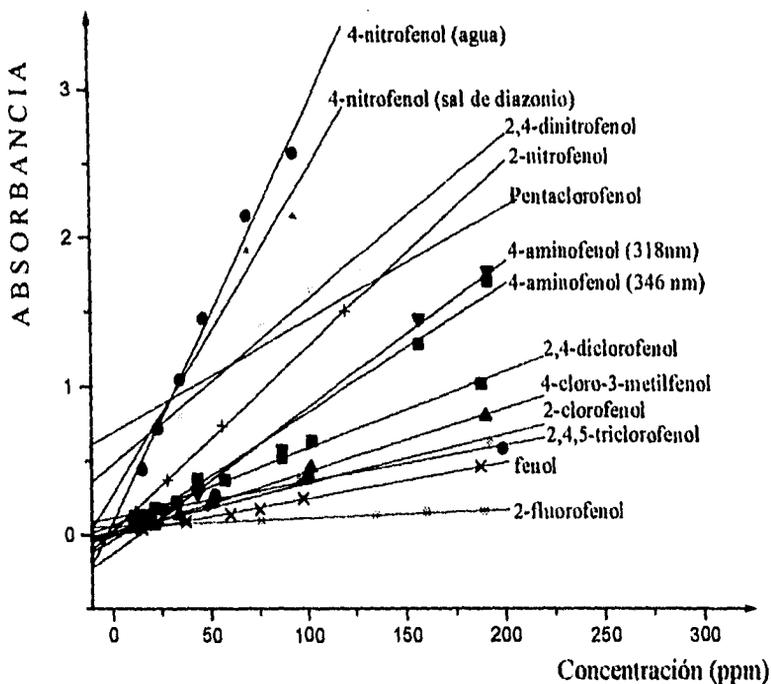


Gráfica 73. Comparación del coeficiente de absorptividad en la longitud máxima de absorción de los azo-compuestos formados con fenol y con el 2-fluorofenol.

Al parecer el pentafluorofenol no participa en la reacción de copulación con la sulfanilamida diazotizada ya que no provoca señal analítica al inyectarlo al sistema FIA.

A partir del estudio de la gráfica 74, la cual se encuentra en la siguiente página, se puede afirmar lo siguiente:

- Aunque tanto el sustituyente cloro como el amino son auxocrómicos, el sustituyente amino tiene un efecto hipercrómico más pronunciado que el grupo cloro, exceptuando el pentaclorofenol.
- Se obtuvo una mayor absorbancia a partir de los productos de la reacción de copulación de los distintos nitrofenoles en comparación con el del fenol, aunque se debe tomar en cuenta que existe contribución por parte del nitrofenoles sin copular.
- El único sustituyente que provocó un efecto hipocrómico fue el fluor.



Gráfica 74. Comparación del coeficiente de absorptividad y de la longitud máxima de absorción de los azo-compuestos formados con todos los fenoles estudiados.

En la tabla 7 se compara la absorbancia de los diferentes azo-compuestos estudiados a 306 nm. Se puede observar que los azo-compuestos que presentan una mayor absorción que el producto de la reacción de copulación del fenol son los formados con el pentaclorofenol, con los nitrofenoles y con el aminofenol.

Tabla 7. Comparación entre la absorbancia a 306 nm presentada por el producto de la reacción de copulación de la sulfanilamida diazotizada y los fenoles estudiados.

COMPUESTO	ABS A 306 nm.
fenol	0.46
2-clorofenol	0.147
2,4 diclorofenol	0.044
4-cloro-3-metilfenol	0.0477
2,4,5 triclorofenol	0.1702
pentaclorofenol	1.79
2-nitrofenol	1.725
4-nitrofenol	3.01
2,4 dinitrofenol	2.5
4-aminofenol	1.92
2-fluorofenol	0.2
pentafluorofenol	0

En la tabla 8 se hace una comparación de las absorbancias a la λ max de cada azo-compuesto estudiado. Se utilizaron los estándares que se encontraban aproximadamente en la mitad de las diferentes curvas de calibración. Se puede observar que el único compuesto que presenta una menor absorbancia que el producto de la reacción de copulación del fenol es el azo-compuesto formado con el 2-fluorofenol y la sulfanilamida diazotizada.

Tabla 8. Comparación entre la absorbancia presentada por el producto de la reacción de copulación de la sulfanilamida diazotizada y los fenoles estudiados a la $\lambda_{\text{máx}}$ de cada azo-compuesto .

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (ppm)	ABS a $\lambda_{\text{máx}}$
fenol	60	0.14
2-clorofenol	50	0.1941
2,4 diclorofenol	57	0.3709
4-cloro-3-metilfenol	50	0.2258
2,4,5 triclorofenol	53	0.26733
pentaclorofenol	47	1.07401
2-nitrofenol	56	0.7370
4-nitrofenol	47	1.4387
2,4 dinitrofenol	51	1.0114
4-aminofenol	45	0.29043
2-fluorofenol	76 ⁽¹⁾	0.09
pentafluorofenol	--	0

⁽¹⁾ En el caso del 2-fluorofenol, se utilizó la primera concentración de la curva de calibración con la que se obtuvo señal analítica.

En la tabla 9 se hace una comparación de las longitudes de máxima absorción de los distintos azo-compuestos estudiados. Si el resultado de la resta de las longitudes de onda es positivo, la presencia de sustituyentes en el anillo fenólico ejerce un efecto hipsocrómico en la absorción del compuesto azoico; si por el contrario es negativo, el efecto de los sustituyentes es batocrómico, ya que provocan una disminución en la energía para llegar a los estados excitados de los orbitales.

Tabla 9. Comparación de las longitudes máximas de absorción de los azo-compuestos formados por la reacción de la sulfanilamida diazotizada con los fenoles estudiados.

COMPUESTO	λ_{\max}	$\lambda_{\max \text{ fenol}} - \lambda_{\max \text{ compuesto}}$
fenol	306	-
2-clorofenol	282	54
2,4 diclorofenol	288	18
4-cloro-3-metilfenol	284	22
2,4,5 triclorofenol	290	16
pentaclorofenol	301	5
2-nitrofenol	299	9
4-nitrofenol	323	-17
2,4 dinitrofenol	302	4
4-aminofenol	346	-40
2-fluorofenol	290	16

El coeficiente de absorptividad no aumenta o disminuye en manera proporcional al número de sustituyentes cloro ni nitro presentes en el anillo fenólico, así por ejemplo, el producto de la reacción de copulación del 2,4-diclorofenol con la sulfanilamida diazotizada tiene un mayor coeficiente de absorptividad que el del 2,4,5-triclorofenol, pero menor al del pentaclorofenol. En cambio, si existe un aumento en la longitud de máxima absorción proporcional al número de sustituyentes cloro en el anillo fenólico, es decir, en la serie homóloga de los clorofenoles, a mayor número de sustituyentes cloro, se necesita menor energía para llevar a cabo la transición energética.

5. CONCLUSIONES

En el sistema FIA es necesario tener un exceso de NaNO_2 , el cual en las condiciones que imperan en el sistema ($\text{pH}=1$) se encuentra en forma de HNO_2 el cual dismuta para formar NO_3^- y NO . No se sabe cuál es el agente nitrosante en la reacción de diazotización, por lo que sólo se puede suponer que se trata del NO ya que es un agente electrofílico fuerte. Sería necesario llevar a cabo estudios de cinética; sin embargo podemos concluir que en las condiciones que imperan en el sistema FIA es imposible que sea el N_2O_3 .

Uno de los factores que más afectan la intensidad de la señal analítica resultó ser la temperatura del baño en el cuál se sumergen los reactores. A mayores temperaturas, se observó un efecto catalítico en la reacción de copulación, así como en la formación de NO .

A mayores longitudes de reactores, se obtiene una disminución en la reproducibilidad y un aumento en la dispersión.

La cinética de la reacción de copulación tiene una gran influencia en la determinación ya que al contrario de lo que se esperaría, al aumentar el flujo disminuye la altura y por lo tanto aumenta la dispersión.

Se verificaron las ventajas que representa el uso de metodologías automatizadas, ya que utilizando la configuración desarrollada es posible analizar aproximadamente 40 muestras por hora con un gasto de reactivos de 2.55 mL de disolución de NaNO_2 al 0.4% p/v en ácido acético al 30% v/v y 1.3 mL de disolución de sulfanilamida al 0.05% p/v en ácido acético al 30% v/v por muestra, calculando lo anterior en base al flujo utilizado; además de que se evitó el error introducido por el manejo manual de los reactivos.

Es posible llevar a cabo la cuantificación de los nitrofenoles utilizando el método propuesto aunque éstos absorban en una longitud de onda muy similar a los productos

de la reacción de copulación con la sulfanilamida diazotizada. Para su cuantificación se debe tomar en cuenta la contribución de los nitrofenoles sinreaccionar con la sal de diazonio.

El coeficiente de absorptividad no aumenta o disminuye en manera proporcional al número de sustituyentes cloro ni nitro presentes en el anillo fenólico, por lo tanto, no se posible predecir este parámetro en series homólogas dentro del sistema FIA propuesto, a diferencia de la longitud de máxima absorción, en la que si existe un aumento proporcional al número de sustituyentes cloro.

No es posible utilizar una sola longitud de onda para el análisis de todos los fenoles; es necesario utilizar un espectrofotómetro de arreglo de diodos con la finalidad de desarrollar un método con detección en varias longitudes de onda, para así lograr la detección simultánea de varios fenoles. Para la cuantificación de los fenoles estudiados en este trabajo, se pueden escoger las siguientes longitudes de onda para llevar a cabo el análisis:

- 285 nm para el análisis de los clorofenoles.
- 310 nm para el análisis de los nitrofenoles.
- 346 nm para el análisis del 4-aminofenol.
- 290 nm para el análisis del 2-fluorofenol.

Es importante mencionar que en la mayoría de los métodos utilizados para la cuantificación de fenoles por espectrometría UV-Vis, no se toma en cuenta el efecto hipercrómico que tienen algunos sutituyentes en el anillo fenólico, por lo que la cuantificación no es tan exacta como si se realizara a diferentes longitudes de onda.

El nivel de detección del método propuesto puede disminuir en por lo menos una orden de magnitud con el uso de alguna técnica de preconcentración de la muestra, sin embargo, tal como está propuesto se puede utilizar la detección de fenoles en el orden de ppm.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Van Der Leeden, F., y cols. "The Water Enciclopedia", 2a edición, p. 443-447, 549,550, editorial Lewis, Estados Unidos (1990).
2. Kirk, "Enciclopedia de la Tecnología Química", tomo VIII, 1a edición, p. 814,815,830,834. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana. México (1962).
3. McKetta, "Encyclopedia of Chemical Processing and Design" Vol 35 1a edición, p. 372-391, editorial Marcel Dekker. Estados Unidos (1993).
4. Gosselin, R.E., y cols., "Clinical Toxicology of Commercial Products", 5a edición, p. II-188 a II-210, III-156 a III-159 y III-344 a III-347, editorial Williams and Wilkins, Estados Unidos (1984).
5. Morrison, R.T., y col., "Química Orgánica", 2a edición, p. 594-624, editorial Fondo Educativo Interamericano, México (1985).
6. March, J., "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure", 1a edición, p. 376-406, editorial McGraw-Hill Kogakusha, LTD, Japón (1968).
7. Packer, J., y col. "A Modern Approach to Organic Chemistry", 1a edición, p. 651-678 editorial Oxford University Press, Gran Bretaña (1958).
8. Ridd, J.H.. Quaterly Reviews, vol. 15, 418-441 (1961).
9. Hughes, E.D., y cols., J. Chem. Soc., 58-65 (1958).
10. Hughes, E.D., y cols., J. Chem. Soc., 65-69 (1958).
11. Hughes, E.D., y cols., J. Chem. Soc., 70-76 (1958).
12. Hughes, E.D., y cols., J. Chem. Soc., 77-82 (1958).
13. Hughes, E.D., y cols., J. Chem. Soc., 82-88 (1958).
14. Hughes, E.D., y cols., J. Chem. Soc., 88-98 (1958).
15. Pascal, P., "Nouveau Traité de Chimie Minerale", tomo X (Azote), editorial Masson et Cie, Francia (1965).

16. Charlot, G., "Curso de Química Analítica General", tomo III 1a edición p. 99-101 editorial Toray-Masson, España (1975).
17. Pine, y cols., "Química Orgánica", 4a edición, editorial McGraw-Hill, México (1988).
18. Patnaik, "A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances", 1a edición, p. 582-593, editorial Van Nostrand Reinhold, Estados Unidos (1992).
19. Dreisbach, "Manual de Toxicología Clínica", 6a edición, p. 332-334. Editorial Manual Moderno. México (1986).
20. The International Technical Information Institute, "Toxic and Hazardous Industrial Chemicals Safety Manual. editorial Maruzen, Japón (1978).
21. Lewis, J., y cols., "Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials", 8va edición, vol. 1, 2 y 3, editorial Van Nostrand Reinhold, Estados Unidos (1989).
22. Ruzicka, J. y cols., Flow Injection Analysis, 2a edición, editorial John Wiley and Sons, Estados Unidos (1982).
23. Gómez Ruíz, H., "Memorias del Curso de Química Analítica Ambiental". ABC Instrumentación, México (1994).
24. Valcarcel M., y col., "Flow Injection Analysis. Principles and Applications", 1a edición, editorial Ellis Harwood Limited, Gran Bretaña (1987).
25. Ruzicka J., Analítica Química Acta, vol. 261, 3-10 (1992).
26. Appelquist, R., y cols., Analítica Química Acta, vol. 180, 1-67 (1986).
27. Robinson, R.K., "Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition", tomos 1, 6 y 7, 1a edición, p. 3548-3552, editorial Academic Press, Estados Unidos (1993).
28. Gibbs, H.D., J. Biol. Chemistry, vol 72, 649-664 (1927).
29. Secretaría de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a edición, p. 164, 165, 674 y 675, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México (1988).

30. Hui, "Enciclopedia of Food Science and Technology", tomo III, 1a edición, p. 2055-2061, editorial John Wiley and Sons Inc., Estados Unidos (1992).
31. Nollet, M.L., "Food Analysis by HPLC", 1a edición, p. 620-641, editorial Marcel Dekker, Inc., Estados Unidos (1992).
32. Clesceri L.S., y cols., "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 17va edición, p. 5-48 a 5-54, 6-137 a 6-146. American Public Health Association, Estados Unidos (1989).
33. Frenzel, W., y col., *Analytica Chimica Acta*, vol. 261, 361-365 (1992).
34. Rodriguez, E., y cols., *Analytica Chimica Acta*, vol. 259, 37-44 (1992).
35. Suzuki, S., *Analytica Chimica Acta*, vol. 261, 361-365 (1992).
36. Khalaf, K.D., *Talanta* vol. 40, 1173-1181 (1993).
37. Fernández-Band, B., y cols., *Anal Chem.*, vol. 63, 1672-1675 (1991).
38. Hernández Mendez, J., *Analytica Chimica Acta*, vol. 228, 317-321 (1990)