



Universidad de Guanajuato

Posgrado Institucional en Química
Facultad de Ciencias Químicas

"APLICACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS EN
LA DETERMINACIÓN DE FUNGUICIDAS UTILIZADOS
EN LA INDUSTRIA CURTIDORA Y SUS POSIBLES
PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICA)
P R E S E N T A:
DAVID MUÑOZ RODRÍGUEZ

Guanajuato, Gto.

Noviembre, 2003.

Agradecimientos

A la Universidad de Guanajuato, mi segunda *Alma Mater*, que me recibió en sus aulas para realizar mis estudios de Maestría en el área de la Química.

Al Posgrado Institucional en Química así como a cada uno de los profesores que, al transmitirme sus conocimientos y experiencias, enriquecieron mi formación académica.

Al Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato, en cuyos laboratorios fue desarrollado este trabajo de investigación. De manera muy especial,

A los Dres. Kazimierz y Katarzyna Wróbel, por todo el apoyo, enseñanzas y consejos que recibí de ellos durante la dirección de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Navarro Mendoza por permitirme el uso del cromatógrafo de gases con detección por espectrometría de masas para los análisis de dicha parte del trabajo así como por sus aportaciones para la culminación del mismo.

A la Dra. María Guadalupe García Jiménez y a la Maestra Florina L. Vilchez Aguado por su amistad, apoyo y consejos durante mi estancia en su laboratorio para la realización de los análisis por HPLC con detector electroquímico.

Al CONACYT por la beca otorgada durante el período Agosto 2001-Julio 2003 para la realización de este trabajo.

Guanajuato, Gto., Octubre, 2003

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado **“Aplicación de diferentes técnicas analíticas en la determinación de fungicidas utilizados en la industria curtidora y sus posibles productos de degradación”** que realizó el Q.I. David Muñoz Rodríguez para obtener el grado de “Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Analítica” en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wróbel Zasada y de la Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk.

“La Verdad os hará Libres”

Dr. Kazimierz Wróbel Zasada

Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk

Sinodales asignados como miembros del jurado para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Analítica que presenta el **Q.I. David Muñoz Rodríguez**:

Dr. Ricardo Navarro Mendoza

Dr. Kazimierz Wróbel Zasada

Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk

Índice

	Pag.
Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Lista de abreviaturas	iv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Breve descripción de los compuestos seleccionados para el estudio y sus aplicaciones industriales	1
1.2 2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazol y los benzotiazoles derivados	3
1.2.1 TCMTB: 2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazol	4
1.2.2 MBT: 2-Mercaptobenzotiazol	4
1.2.3 BT: Benzotiazol	6
1.2.4 DTBT: 2, 2'-(Ditio-bis)benzotiazol	6
1.3 PCF: Pentaclorofenol	7
1.4 MBO: Mercaptobenzoxazol	7
1.5 Los benzotiazoles como contaminantes	8
1.5.1 Contaminación medio ambiental	8
1.5.2 Exposición laboral	10
1.5.3 Contaminación de material médico	10
1.6 Revisión bibliográfica de los métodos de determinación de los benzotiazoles en diferentes materiales de interés medio ambiental, industrial y clínico	11
1.7 Selección de las técnicas analíticas para el estudio	13
1.7.1 Extracción en fase sólida	13
1.7.2 Cromatografía líquida de alta resolución	16
1.7.2.1 Detección espectrofotométrica	18
1.7.2.2 Detección electroquímica	20
1.7.3 Voltamperometría	23
1.7.4 Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas	25
Capítulo 2. Objetivos	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29
Capítulo 3. Parte experimental	30
3.1 Instrumentos	30
3.2 Software	30
3.3 Equipo y material de laboratorio	31
3.4 Reactivos, disoluciones y muestras	31
3.4.1 Determinación por HPLC con detección espectrofotométrica	31
3.4.2 Determinación por HPLC con detección espectrofotométrica previa derivatización precolumna con NBD-Cl	32
3.4.3 Determinación por HPLC con detección amperométrica	32
3.4.4 Determinación por voltamperometría adsorbtiva de redisolución catódica	32
3.4.5 Determinación por cromatografía de gases con detector por espectrometría de masas	32
3.5 Muestras utilizadas en este estudio	32

Capítulo 4. Resultados y discusión	33
4.1 Análisis del fungicida TCMTB, sus productos de degradación y del PCF por HPLC con detección espectrofotométrica	34
4.1.1 Derivatización pre-columna con 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl).	38
4.2 Aplicación de la detección amperométrica en la determinación del MBT en muestras ambientales y clínicas por cromatografía de líquidos de alta resolución	44
4.3 Estudio sobre la posible aplicación de la voltamperometría adsorbtiva de redisolución catódica con onda catalítica de protones en la determinación del MBT en aguas de desecho	57
4.4 Aplicación de la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en el análisis de benzotiazoles	61
Capítulo 5. Conclusiones	68
5.1 Análisis de benzotiazoles y de PCF por HPLC con detección espectrofotométrica	68
5.2 Aplicación de la detección amperométrica en la determinación del MBT por HPLC en muestras ambientales y clínicas	70
5.3 Estudio sobre la posible aplicación de la voltamperometría adsorbtiva de redisolución catódica en la determinación del MBT en aguas de desecho	71
5.4 Análisis del MBT por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas	71
5.5 Conclusiones generales	72
Bibliografía	73

Índice de figuras

Figura	Nombre	Pag.
1.	Estructuras de los derivados del benzotiazol	3
2.	Rutas más importantes para la síntesis del TCMTB	4
3.	Reacción de oxidación del MBT	5
4.	Equilibrio ácido-base del MBT	5
5.	Formas tautoméricas del MBT	5
6.	Estructura del pentaclorofenol (PCF)	7
7.	Estructura del 2-mercaptobenzoxazol (MBO)	7
8.	Degradación del TCMTB en el medio ambiente	9
9.	Formación de la onda catalítica de protones	24
10.	Reacciones de derivatización pre-columna del pentafluorobencilbromuro con diferentes grupos funcionales.....	28
11.	Cromatograma típico de la mezcla de los estándares (0.80 mg·l ⁻¹ de MBO y MBT, 3.2 mg·l ⁻¹ de BT, 1.6 mg·l ⁻¹ de TCMTB, 1.6 mg·l ⁻¹ de MTBT y 16.0 mg·l ⁻¹ de PCF) obtenido por HPLC en fase inversa con detección en (----) 280 nm y (—) 324 nm (condiciones cromatográficas en Tabla 10)	35
12.	Condiciones de extracción en fase sólida en la separación/preconcentración de los benzotiazoles, MBO y PCF en agua residual	36
13.	Cromatograma típico por HPLC del extracto (SPE) del agua de desecho: (—) detección en 280 nm y (-----) en 324 nm. (condiciones cromatográficas en la Tabla 10)	37
14.	Estructura de la 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl)	38
15.	Reacción de derivatización del MBT con el NBD-Cl	39
16.	Esquema del procedimiento de derivatización del MBT y MBO con NBD-Cl.....	40
17.	Espectros de absorción del MBO, 30.0 mg·l ⁻¹ (----) y MBT, 30.0 mg·l ⁻¹ (—) en acetato de etilo antes (a) y después de la derivatización con NBD-Cl (b).....	41
18.	Cromatograma de la mezcla de estándares MBT (8.0 µg·l ⁻¹) y MBO (20.0 µg·l ⁻¹) después de la derivatización pre-columna obtenido por HPLC en fase inversa con detección en 390 nm.....	42
19.	Voltamperogramas cíclicos del MBT (—) y MBO (----). (C _{MBO} = C _{MBT} = 0.10 g·l ⁻¹ , electrolito soporte H ₃ PO ₄ (3.0 mmol·l ⁻¹) : acetonitrilo (60:40), velocidad de barrido 100 mV·s ⁻¹)	45
20.	Cromatogramas típicos de la mezcla de MBT y MBO (0.5 mg·l ⁻¹) obtenidos con un electrodo de oro (—) y otro de carbón vítreo (----). (Las condiciones experimentales se describen en la Tabla 14)	47

Figura	Nombre	Pag.
21.	Disminución de la señal amperométrica de (a) MBT y (b) MBO en inyecciones consecutivas. ($C_{MBT} = C_{MBO} = 5.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, electrodo de Au, 900 mV, sin columna cromatográfica)	48
22.	Efecto de la aplicación del potencial negativo durante (a) 0.1 y (b) 2 min después de cada ciclo cromatográfico en la señal amperométrica del MBT. ($C_{MBT} = 5.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, electrodo de oro, área de superficie 28 mm^2 , 900 mV).....	49
23.	Curva de calibración externa para el MBT (0.0, 3.0, 6.0, 9.0 y $15.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) utilizando MBO como estándar interno ($30.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	51
24.	Cromatograma de la muestra de agua de desecho municipal. (El tratamiento de la muestra se describe en el texto. Condiciones de separación y detección en la Tabla 14)	53
25.	Cromatograma de la muestra de agua de desecho municipal fortificada con MBO y MBT (Concentración en la muestra $57.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). (—) muestra sin tratamiento,(----) después de extracción y preconcentración por evaporación del disolvente	54
26.	Cromatograma de la muestra de orina fortificada con (—) $0.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO y de MBT. Columna cromatográfica: Kromasil C18, $5 \text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, fase móvil: ácido fosfórico ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 2.4): Acetonitrilo (73:27), las demás condiciones cromatográficas y de detección como en la Tabla 14)	56
27.	Voltamperograma de $5.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ MBT en presencia de (---) $25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 y (—) $25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de TFA (condiciones instrumentales en la Tabla 16)	58
28.	Efecto de la concentración del (—) ácido trifluoroacético y del (---) ácido fosfórico en la señal catalítica de protones generada por una concentración de $5.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT	59
29.	Efecto del (—) acetonitrilo y del (- - -) acetato de etilo en la magnitud de la señal de onda catalítica de protones generada por $5.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT en presencia de $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de (a) ácido fosfórico y (b) trifluoroacético.....	61
30.	Esquema del procedimiento de derivatización con PFBB	62
31.	Cromatogramas GC-MS (SIM) de la mezcla de estándares del MBO y MBT obtenidos después de la derivatización con PFBB (a) y sus respectivos espectros de masas (b). (Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 17)	63
32.	Ecuaciones de la reacción de derivatización del (a) MBT y (b) MBO con PFBB	64
33.	Cromatogramas GC-MS del agua residual (a, c, e) y agua residual enriquecida con MBT y MBO (b, d, f) registrados en diferentes condiciones de detección.	66

Índice de tablas

Tabla	Nombre	Pag.
1.	Datos generales de los funguicidas comercialmente disponibles	2
2.	Solubilidad del MBT en solventes orgánicos	5
3.	Solubilidad del DTBT en solventes orgánicos	6
4.	Procedimientos reportados para el análisis de los benzotiazoles	12
5.	Límites de detección (LD) de algunas metodologías del análisis de benzotiazoles	13
6.	Clasificación de los sorbentes en SPE	15
7.	Propiedades y características de las columnas para cromatografía de gases.....	26
8.	Reacciones de derivatización comúnmente utilizadas en GC	27
9.	Compuestos seleccionados, sistemas químicos y estrategias analíticas propuestas para el estudio	33
10.	Condiciones cromatográficas seleccionadas para la separación del TCMTB, MBT, BT, MTBT, PCF y MBO por HPLC en fase inversa	34
11.	Parámetros evaluados en el proceso de calibración para el TCMTB, MBT, MBO, BT, MTBT y PCF por HPLC en fase inversa	36
12.	Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración del MBT utilizando MBO como estándar interno, sin y con derivatización pre-columna con NBD-Cl	43
13.	Comparación de los parámetros analíticos evaluados en el análisis del MBT y MBO por cromatografía líquida con detección amperométrica. (0.1 mg·l ⁻¹ MBT y MBO, señal analítica medida como la altura de pico cromatográfico)..	50
14.	Condiciones experimentales para el análisis del MBT y MBO por cromatografía líquida de alta resolución con detección amperométrica	50
15.	Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración del MBT utilizando el método de estándar interno (MBO). (Condiciones experimentales en la Tabla 14)	51
16.	Condiciones de trabajo utilizadas en la determinación del MBT por voltamperometría adsorptiva de redisolución catódica, basada en la formación de la onda catalítica de protones	57
17.	Condiciones instrumentales en la separación/detección de los benzotiazoles por GC-MS	62

Lista de abreviaturas

IIC	Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato
TCMTB	2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazol
PCF	Pentaclorofenol
MBT	2-Mercaptobezotiazol
MEK	Metiletilcetona
BT	Benzotiazol
MTBT	Metiltiobenzotiazol
DTBT	2,2'-(Ditio-bis)-benzotiazol
PM	Peso molecular
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
n_D^{20}	Índice de refracción
MBO	2-Mercaptobenzooxazol
OBT	2-Hidroxibenzotiazol
MBTSO ₃	2-Benzotiazolsulfonato
CMB	2-(Carboximetiltio)benzotiazol
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
SPE	Solid phase extraction (Extracción en fase sólida)
SPME	Solid phase micro-extraction (Micro-extracción en fase sólida)
RP	Reverse phase (Fase inversa)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
CE	Electrophoresis capilar (Electroforesis capilar)
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografía de capa delgada)
GC	Gas chromatography (Cromatografía de gases)
MS	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)
UV/Vis	Espectrometría ultravioleta-visible
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
nm	Nanómetros
λ	Longitud de onda
NBD-Cl	4-Cloro-7-nitrobenzofurazona
ED	Electrochemical detector (Detector electroquímico)
PFBB	Pentafluorobencilbromuro
TFA	Ácido trifluoroacético
λ_{anal}	Longitud de onda analítica
λ_{ref}	Longitud de onda de referencia
t_{ret}	Tiempo de retención
r^2	Coefficiente de determinación
SD	Desviación estándar
S/N	Signal-to-noise ratio (Relación señal ruido)
mV	Milivolts
Hz	Hertz
ms	Milisegundos

Bu ₄ N ⁺ OH ⁻	Hidróxido de tetrabutilamonio
cps	Cuentas por segundo
SIM	Monitoreo Selectivo de Iones (Selective Ion Monitoring)
m/z	Relación masa-carga
NIST	National Institute of Standard and Technology (Instituto nacional de estandarización y tecnología)

Capítulo 1. Introducción

En este trabajo se desarrollan procedimientos analíticos para evaluar el impacto que pudiera tener el uso de los fungicidas en la industria curtidora, en el medio ambiente y en la salud de las personas con exposición laboral. El estudio es la continuación de una investigación realizada anteriormente en el Instituto de Investigaciones Científicas (IIC), cuyos resultados fueron publicados en forma de una tesis de Maestría [1] y dos artículos [2, 3]. A diferencia de los estudios anteriores, en el presente trabajo se tomaron en cuenta dos fungicidas utilizados en curtidurías de León, Gto.: el 2-[(tiocianometil)tiol]-benzotiazol (TCMTB) y el pentaclorofenol (PCF). El interés científico fue no solamente en el análisis de las muestras medio ambientales sino también en la cuantificación del mercaptobenzotiazol (MBT, el metabolito principal del TCMTB) en orina humana. Una importante novedad en la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución fue el uso de la detección electroquímica y las pruebas de derivatización de los benzotiazoles para aumentar la sensibilidad de la detección espectrofotométrica. Por otra parte, también se aplicó la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas para la determinación del MBT. A continuación se resumen brevemente los antecedentes del trabajo y se justifica la selección de las técnicas analíticas empleadas en el estudio.

1.1 Breve descripción de los compuestos seleccionados para el estudio y sus aplicaciones industriales

La piel cruda presenta una mala apariencia, rigidez, poca estabilidad y además es susceptible a la descomposición por el crecimiento de microorganismos tales como hongos y bacterias. Por lo tanto, para poder utilizar la piel como materia prima para la elaboración de zapatos, cinturones, bolsas y otros artículos de piel, es necesario someterla al siguiente tratamiento: (1) lavado con agua, (2) tratamiento con agentes reductores u oxidantes, (3) tratamiento enzimático, (4) lavado con una solución NaCl-H₂SO₄, (5) adición de tensoactivos y (6) curtido con sales de Cr (III) [1].

Después del proceso de curtido, la piel presenta una mejor apariencia, es suave, fácil de manejar, resistente y no puede ser degradada por microorganismos. Así, al finalizar este proceso, la piel se encuentra parcialmente tratada (estado “wet blue”) y se puede almacenar para su uso posterior. No obstante, un problema que generalmente ocurre durante el

almacenamiento es el crecimiento de hongos debido a parámetros tales como ligera acidez, humedad, incremento de temperatura y presencia de grasa en la piel. Hongos de las especies *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma* o *Alternaria* afectan negativamente la apariencia y resistencia de la piel provocando importantes defectos como manchas no deseadas generadas por el enmohecimiento, cristalización en la superficie de la piel e irregularidades en el proceso de acabado y pigmentación [1].

Para evitar lo anterior, es necesario inhibir el crecimiento de los hongos en las pieles por lo cual se añaden funguicidas a los baños de curtido. En la Tabla 1 se enlistan los funguicidas disponibles comercialmente que son utilizados en la industria curtidora.

Tabla 1. Datos generales de los funguicidas comercialmente disponibles [4].

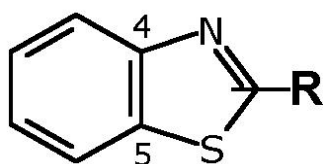
	Nombre Comercial	Compuesto Activo	pH en la formulación	Solubilidad en agua, 25°C	Disolventes utilizados en las formulaciones
Derivados fenólicos		Fenol	4.7	9.3%	Etanol, Acetona
	Preventol O	o-fenil-fenol		0.7%	Alcoholes de bajo peso molecular, acetona, aceites
	Preventol ON, Preventol ON extra, Mystox WFA	o-fenil-fenato de sodio	10	Soluble	Alcoholes de bajo peso molecular
		p-nitrofenol		1.6%	Etanol, acetona, éter, aceites
		m-cresol		2.5%	Etanol, éter
	Preventol CMK Mystox B	p-cloro-m-cresol pentaclorofenol		4	Poco soluble Soluble
Mezcla de fenoles	Preventol WB	Mezcla de fenoles		Soluble	Etanol, acetona, MEK, acetato de etilo
	Preventol L	Pentaclorofenol y otros fenoles	9.6	Soluble	Alcoholes de bajo peso molecular, acetona
	Nercolan F12, Nercolan F24, Nercolan GL0,	Mezcla de fenoles clorados	7.0-7.5	Dispersión	Alcoholes, acetona
Compuestos de nitrógeno y azufre	Busan 80, Busan 30, Leathergard	TCMTB	6-7	0.3% Dispersión	Acetona, xileno, nafta y glicoles
	Slimicide MC	Metileno bis-tiocianato	7.5	0.3% dispersión	Acetona, MEK
	Busan 1009	TCMTB + Metileno bis-tiocianato	7-8.5	Dispersión	Acetona, xileno, nafta y glicoles
	Busan 40	N-hidroximetil potasio + N-metilditiocarbamato	8-10	Soluble	
	Busan 52	N-hidroximetil potasio + N-metilditiocarbamato + 2-mercaptobenzotiazol de Na	8-10	Soluble	

Cabe destacar que, la mayoría de los fungicidas utilizados son de naturaleza lipofílica, lo que limita su uso en las soluciones acuosas, y por lo cual las formulaciones comerciales se preparan en disolventes orgánicos con adición de emulsificantes [1]. Además, la mayoría de dichos fungicidas tiene como componente activo compuestos derivados del fenol.

Por mucho tiempo, los fungicidas más utilizados en la industria curtidora fueron compuestos organoclorados como el pentaclorofenol. Sin embargo, debido a su alta toxicidad y persistencia ambiental, estos fueron gradualmente sustituidos por compuestos menos tóxicos como los derivados del benzotiazol y en particular, el 2-[(tiocianometil)tiol]-benzotiazol (TCMTB). Algunas formulaciones comerciales cuyo componente activo es el TCMTB son el Busan 30, Busan 80, Leathergard y Busan 1009. Otro fungicida comercial cuyo componente activo es un benzotiazol (MBT) es el Busan 52 (Tabla 1).

1.2 2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazol y los benzotiazoles derivados

Los benzotiazoles son compuestos heterocíclicos que contienen un anillo tiazol condensado por sus posiciones 4 y 5 a un núcleo bencénico [1]. Sus derivados se obtienen sustituyendo el hidrógeno (-H) del anillo tiazol (posición 2) por un grupo funcional (-R), el cual puede ser, por ejemplo, un grupo tiol o hidroxilo (Figura 1).



Grupo funcional -R	Abreviación	Nombre químico
-H	BT	Benzotiazol
-SH	MBT	2-Mercaptobenzotiazol
-SCH ₃	MTBT	Metiltiobenzotiazol
-S-CH ₂ -SCN	TCMTB	2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazol
-C ₇ H ₄ NS ₂	DTBT	2,2'-(Ditio-bis)-benzotiazol

Figura 1. Estructuras de los derivados del benzotiazol.

Los benzotiazoles forman parte de la estructura molecular de un gran número de productos naturales, biocidas, drogas, saborizantes de alimentos y aditivos químicos. Ejemplos característicos son la vitamina B₁ y el acelerador de la vulcanización del caucho 2-mercaptobenzotiazol [5]. En la industria los benzotiazoles más utilizados son el

benzotiazol (BT), el 2,2'-(ditio-bis)benzotiazol (DTBT), el 2-[(tiocianometil)tiol]-benzotiazol (TCMTB) y el 2-mercaptobenzotiazol (MBT); a continuación se describen algunas propiedades fisicoquímicas y aplicaciones industriales de dichos compuestos.

1.2.1 TCMTB: 2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazol

El TCMTB presenta la fórmula química $C_9H_6N_2S_3$ (PM 238.4 $g \cdot mol^{-1}$). Tiene una temperatura de ebullición mayor a $120^\circ C$ y punto de fusión menor a $-10^\circ C$. Su densidad relativa con respecto al agua es de 1.4, y su solubilidad en agua es de 33.0 $mg \cdot l^{-1}$ [6]. Se degrada rápidamente a MBT bajo condiciones alcalinas, a altas temperaturas ($50^\circ C$), en presencia de sulfuros o cuando se expone a la luz [1].

La síntesis del TCMTB se realiza a temperatura ambiente a partir de la sal del 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y un agente clorinante (Figura 2).

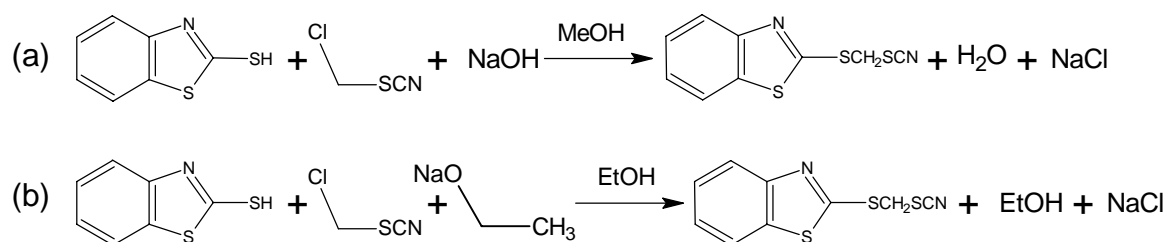


Figura 2. Rutas más importantes para la síntesis del TCMTB.

De acuerdo con la Figura 2, es posible seguir dos rutas de síntesis. En (a), el TCMTB se obtiene por reacción del MBT con el clorometilcianato e hidróxido de sodio en metanol; mientras que en (b) el hidróxido de sodio se sustituye por etóxido de sodio y el metanol por etanol absoluto. Una vez sintetizado, el TCMTB se utiliza en formulaciones para proteger la madera, papel y piel del crecimiento de microorganismos [1].

1.2.2 MBT: 2-Mercaptobenzotiazol

El MBT es un polvo de color amarillo pálido (pf $170^\circ C$) y olor desagradable. Su fórmula química es $C_7H_5NS_2$ (PM 167.3 $g \cdot mol^{-1}$) [6]. Es estable a temperatura ambiente, pero a temperaturas elevadas se descompone formando óxidos de azufre y de nitrógeno. Además, se oxida con facilidad formando el dímero DTBT (Figura 3) [1].

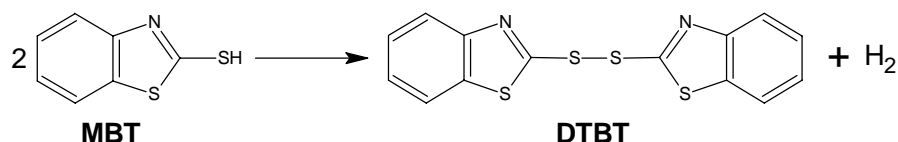


Figura 3. Reacción de oxidación del MBT.

El MBT es insoluble en agua a pH neutro y soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (Tabla 2).

Tabla 2. Solubilidad del MBT en solventes orgánicos [6].

Solubilidad a 25°C (g.l ⁻¹)			
Alcohol	20.0	CCl ₄	< 2.0
Acetona	100.0	Eter	10.0
Benceno	10.0	Nafta	< 5.0

Su solubilidad se incrementa en soluciones alcalinas debido a su carácter ácido (pKa ~ 7). La Figura 4 muestra su equilibrio ácido-base.

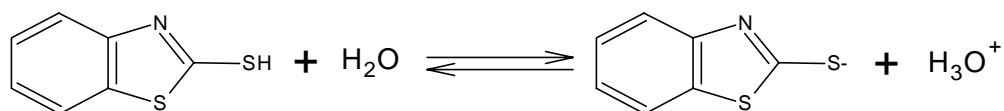


Figura 4. Equilibrio ácido-base del MBT.

El MBT presenta un equilibrio entre las formas tautoméricas tiol (>C-SH) y tiona (>C=S), Figura 5. La primera es la forma mayoritaria en medio alcalino hasta ligeramente ácido, mientras que la segunda prevalece en medio ácido.

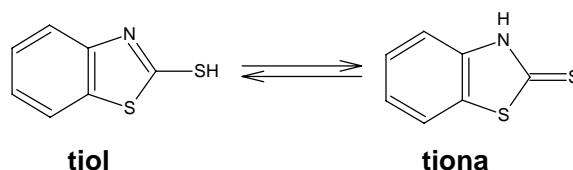


Figura 5. Formas tautoméricas del MBT.

Esta tautomería permite al MBT presentar afinidad hacia iones metálicos tales como Hg(II), Cu(II) y Ni(II), entre otros. Los estudios realizados sugieren que la estructura tiona le permite formar complejos con los cationes metálicos, mientras que la forma tiol favorece la

formación de las sales [1]. Un ejemplo de estos últimos compuestos es una sal de Zn ($C_{14}H_{10}N_2S_4Zn$, PM 399.9 $g \cdot mol^{-1}$) comercialmente conocida como Bantex [6].

Para aplicaciones industriales el MBT es conocido comercialmente como Captax, Dermacid, Mertax o Thiolax. El MBT se utiliza como sustrato en la síntesis del TCMTB (Figura 2); se emplea además como aditivo en la industria vulcanizadora para fabricar diversos productos de goma (zapatos, guantes, cable eléctrico, etc.) y en la industria de recubrimientos electroquímicos para el electroplatinado en Ag, Ni y Co. También se utiliza en forma de una sal de sodio soluble en agua (NaCap) como colector de flotación en la refinación de minerales. De igual forma, tiene aplicaciones como funguicida, bactericida, agente anticorrosivo y como preservativo en pinturas para madera y látex [1, 7].

1.2.3 BT: Benzotiazol

El benzotiazol es un líquido con olor semejante a la quinolina y con fórmula química C_7H_5NS (PM 135.2 $g \cdot mol^{-1}$); su densidad es 1.426 $g \cdot ml^{-1}$ y su índice de refracción (n_D^{20}) 1.638. Es ligeramente soluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos como alcohol y disulfuro de carbono, entre otros [6]. Es usado principalmente como funguicida, herbicida, agente anti-algal [5] y como saborizante en los alimentos.

1.2.4 DTBT: 2, 2'-(Ditio-bis)benzotiazol

El DTBT se presenta en forma de cristales amarillos (pf 180°C), cuya fórmula química es $C_{14}H_8N_2S_4$ (PM 332.5 $g \cdot mol^{-1}$). Es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos (Tabla 3) [6]. Se produce por la oxidación del 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y se emplea en la industria del caucho como aditivo químico para acelerar la vulcanización [1].

Tabla 3. Solubilidad del DTBT en solventes orgánicos [6].

Solubilidad a 25°C ($g \cdot l^{-1}$)			
Alcohol	< 2.0	CCl_4	< 2.0
Acetona	< 5.0	Eter	< 2.0
Benceno	< 5.0	Nafta	< 5.0

1.3 PCF: Pentaclorofenol

Este compuesto se presenta en forma de cristales semejantes a agujas (pf 190-191°C) y su fórmula química es C_6HCl_5O (PM 266.35 $g \cdot mol^{-1}$), Figura 6. Su temperatura de ebullición es de 309-307°C y su densidad 1.978 $g \cdot ml^{-1}$. Es poco soluble en agua (8.0 $g \cdot l^{-1}$) pero su solubilidad aumenta en soluciones alcalinas y en disolventes orgánicos tales como éter y benceno [6].

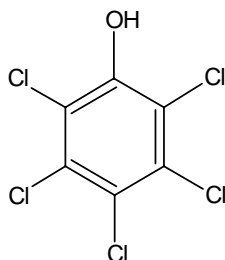


Figura 6. Estructura del pentaclorofenol (PCF).

Entre las aplicaciones del PCF destaca su uso como insecticida, herbicida y como un fungicida generalmente aplicado para pinturas, madera, papel y piel. Sin embargo, también presenta un inconveniente, no se degrada fácilmente en el medio ambiente, y además es altamente tóxico y bioacumulable en los organismos vivos. En los humanos se le atribuyen efectos dañinos como esterilidad, cáncer y daños al sistema nervioso central [8]. A pesar de disminución de las aplicaciones del PCF en la industria curtidora, la persistencia de este compuesto en el medio ambiente justifica el interés en el desarrollo de los procedimientos analíticos adecuados para controlar sus niveles en materiales medio ambientales.

1.4 MBO: 2-Mercaptobenzoxazol

El MBO (Figura 7) ó 2-benzoxaetiol, es un polvo cristalino color pardo (pf 193-194°C) cuya fórmula química es $C_7H_5NO_2$ (PM 151.2 $g \cdot mol^{-1}$) [9].

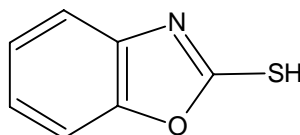


Figura 7. Estructura del 2-mercaptobenzoxazol (MBO).

En este estudio, gracias a las similitudes estructurales entre el MBO y los benzotiazoles (en particular con el MBT), este compuesto fue considerado como el posible estándar interno para su aplicación en las técnicas cromatográficas.

1.5 Los benzotiazoles como contaminantes

El uso de los derivados del benzotiazol en la industria curtidora entre otras, genera una importante descarga de dichos compuestos al medio ambiente debido a la emisión de gases y/o aguas residuales que contienen benzotiazoles. En consecuencia, diferentes benzotiazoles fueron detectados como contaminantes de efluentes industriales, materiales medio ambientales e incluso en zapatos de goma y jeringas de plástico. Los contaminantes mayoritarios fueron el MBT y BT, que son los principales productos de la degradación del TCMTB y DTBT.

1.5.1 Contaminación medio ambiental

El TCMTB utilizado como funguicida en la industria curtidora no es eliminado por completo en las plantas de tratamiento basadas en el uso de microorganismos. El análisis de efluentes de tenería introducidos a plantas de tratamiento reportó que solo fue degradado un 75% del contenido inicial de TCMTB. En este trabajo se observó que los metabolitos de la degradación del TCMTB son el MBT, BT y MTBT [10], Figura 8. Además, el MBT se puede convertir en DTBT por oxidación.

Así, la variedad de los benzotiazoles que pueden encontrarse en las muestras ambientales incluye a los compuestos utilizados en los procesos industriales (por ejemplo TCMTB y MBT), así como los productos de su degradación (como el BT, MTBT y DTBT). En la bibliografía se reportaron también otros metabolitos del TCMTB como el 2-hidroxibenzotiazol (OBT) y el 2-benzotiazolsulfonato (MBTSO₃) [11-13]. De Wever et al. propusieron que los mono- y di-hidroxibenzotiazoles pudieran ser los productos de transformación del benzotiazol sulfonado, el cual es el producto de la degradación del BT y MBT en los medios acuáticos [14].

Varios estudios demostraron la presencia del BT en el agua de ríos aledaños a las zonas industriales. En muestras de agua de Rhine, países bajos se encontró una concentración de 0.002 µg·l⁻¹ [15]; el BT también se detectó en los ríos Manachal, Mausica y Caroni en Trinidad, pero sin especificar las concentraciones [16]. Bajas concentraciones

de BT fueron encontradas en agua potable en Cincinnati, Ohio [17] y en Gran Bretaña [18], mientras que en algunas ciudades de Canadá se reportaron concentraciones de $0.1-0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [19]. El BT fue también determinado en aguas residuales provenientes de fábricas de llantas y otras industrias. Así, en el análisis de una serie de compuestos orgánicos en los efluentes de dos plantas productoras de llantas se reportó la presencia del BT y MBT. Por otra parte, el análisis de aguas residuales de una planta de manufactura de caucho reportó una concentración de BT de $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que en aguas de desecho de una fábrica de llantas se encontraron concentraciones de $20.0-60.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Además, efluentes procedentes de la industria del papel reportaron la presencia de MBT en una concentración de $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [1].

Un grupo de biocidas fue analizado en muestras de aguas de mar provenientes de la costa mediterránea española (Catalonia y Almeira, España) reportándose la presencia de TCMTB en concentraciones no mayores de 0.0010 y $0.020 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [20]. Los estudios realizados en estuarios contaminados por una fábrica de llantas mostraron que el BT es tóxico para el desarrollo de peces [21]. El BT también fue detectado en almejas originarias de Japón, mientras que el MBT se ha detectado en sedimentos marinos y peces [1].

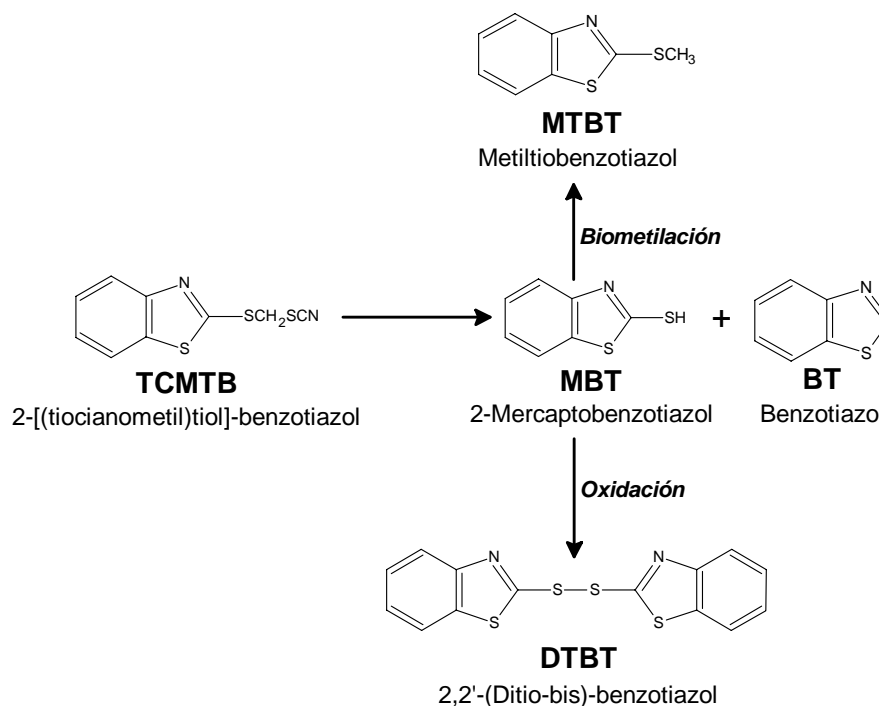


Figura 8. Degradación del TCMTB en el medio ambiente.

1.5.2 Exposición laboral

La exposición de trabajadores a ambientes laborales contaminados con benzotiazoles puede generar un impacto en su salud. Por ejemplo, el MBT es un compuesto probablemente carcinógeno que puede resultar dañino por inhalación, ingestión o por absorción de la piel; además es muy irritante cuando entra en contacto con los ojos [22].

En un estudio realizado a los trabajadores de aserraderos ubicados en British Columbia, éstos reportaron síntomas como sarpullido, quemaduras o picazón en la piel debido a la exposición al funguicida TCMTB [23]; mientras que una investigación realizada en una fábrica de llantas reportó un brote de dermatitis ocupacional ocasionada por un derivado del MBT llamado 2-(2',4'-dinitrofeniltio)-benzotiazol utilizado en la producción de los neumáticos [24].

Finalmente, el MBT y DTBT se han estudiado como sensibilizadores por contacto en productos de goma [25] y se han reportado como agentes alérgicos presentes en distintos tipos de zapatos [26, 27]. Un estudio demostró que el MBT es el compuesto responsable de causar la dermatitis del calzado, la cual afectó los dedos y el dorso del pie en las personas expuestas [28].

1.5.3 Contaminación de material médico

La falta de control en la aplicación del MBT como aditivo en la industria de la vulcanización ha dado como resultado la contaminación de los accesorios de goma utilizados en hospitales, así como de las sustancias con las que entraron en contacto.

Los análisis realizados en empaques de goma, jeringas y soluciones inyectables indicaron la presencia de MBT y/o DTBT como contaminantes [29-31]. Los resultados indicaron que dichos compuestos difundían hacia el líquido cuando los empaques de goma presentes en los envases entraban en contacto con la solución [32].

Otros benzotiazoles como el 2-(2-hidroxietilmercapto)-benzotiazol [33], 2-hidroxibenzotiazol, 2-(metilmercapto)-benzotiazol, 2-(2-hidroxietoxi)-benzotiazol y 2-(2-hidroxietilmercapto)-benzotiazol [34] se han detectado como contaminantes en jeringas que contenían soluciones inyectables. La formación de estos compuestos se atribuye a una reacción entre el MBT utilizado en la elaboración de las jeringas y el óxido de etileno utilizado para su esterilización.

El tratamiento de pacientes con fármacos, accesorios y/o equipo médico contaminado con benzotiazoles abre una vía de entrada de dichos compuestos hacia el organismo humano. En relación a esto, un estudio realizado por Meek J.H. y Pettit B.R. reportó la presencia del 2-(carboximetiltio)benzotiazol (CMB) en suero de bebés prematuros que recibieron terapia intravenosa por tiempo prolongado. Los investigadores encontraron que el CMB provenía de los accesorios de goma de los equipos utilizados para administrar terapia intravenosa [35].

1.6 Revisión bibliográfica de los métodos de determinación de los benzotiazoles en diferentes materiales de interés medio ambiental, industrial y clínico

La cuantificación de los benzotiazoles en las muestras medio ambientales y clínicas es una difícil tarea analítica debido a las bajas concentraciones y, en algunos casos a la inestabilidad de los compuestos a determinar, así como a la compleja composición de la muestra. En cuanto a los usos industriales del TCMTB, la importancia de controlar su niveles en aguas de desecho ha sido reconocida por la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) en E.U.A. En el método EPA número 637 se emplea la extracción líquido – líquido (cloruro de metileno) seguido por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica para la determinación del fungicida y del MTBT en este tipo de muestras [36]. La inconveniencia del método recomendado es el volumen grande de muestra y el riesgo de pérdidas del TCMTB debido a su descomposición a temperatura elevada. En la revisión bibliográfica se encontraron trabajos sobre la determinación de dicho fungicida y de sus posibles metabolitos en diferentes tipos de muestra. El resumen de los datos encontrados se presenta en la Tabla 4.

En cada uno de los trabajos citados en la Tabla 4, se llevó a cabo un tratamiento previo de la muestra con el fin de lograr la concentración y separación de los compuestos de interés de otros componentes de la muestra que pudieran interferir en la etapa de cuantificación. En gran mayoría de los estudios la técnica seleccionada fue la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) [37]. De acuerdo con las características de los benzotiazoles de interés (compuestos orgánicos no volátiles), los extractos de muestras fueron analizados preferentemente por la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP HPLC, por sus siglas en inglés). Cabe mencionar a los trabajos, en donde la separación de los benzotiazoles se obtuvo por cromatografía de gases, previa derivatización

del analito para su conversión en un compuesto volátil (por ejemplo en la reacción con pentafluorobencilbromuro se obtuvieron los respectivos tioéteres de los metabolitos del TCMTB [38]). En la cromatografía de gases, la aplicación de un sistema de micro extracción en fibra (SPME, por sus siglas en inglés) presenta la ventaja de obtener la adsorción de los analitos en la superficie de una fase sólida (sistema “headspace”, por ejemplo) y utilizar este mismo dispositivo para introducir los compuestos retenidos en la fibra a la columna cromatográfica [5]. Finalmente, cabe mencionar el uso de otras técnicas de separación como la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) y la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).

Tabla 4. Procedimientos reportados para el análisis de los benzotiazoles.

Muestra	Compuestos de interés	Tratamiento pre-analítico	Técnica analítica	Benzotiazoles encontrados	Ref.
Orina de ratas y humanos	TCMTB	Hidrólisis ácida Derivatización	GC-MS	MBT	[38]
Desechos de Curtiduría	Productos de Ozonación del MBT	Extracción con disolventes	RP HPLC-UV GC-MS CE-UV	MBT, BT	[39]
Licores de curtido	TCMTB	Extracción con disolventes	HPLC-UV	MBT	[2]
Desechos Industriales	Microcontaminantes Orgánicos	SPE	RP HPLC -UV TLC GC-MS	TCMTB, MBT, MTBT	[40, 41]
Sedimentos	Microcontaminantes Orgánicos	SPE	GC-MS	Benzotiazoles monosustituidos	[42]
Agua superficial	Mezcla de pesticidas	SPE	HPLC-MS-MS	BT	[43]
Agua de Mar	Diferentes Biocidas	SPE	RP HPLC-MS	TCMTB	[44]
	Mezcla de herbicidas	SPE	HPLC-UV HPLC-MS	TCMTB	[45]
	Mezcla de pesticidas	SPE	GC-MS	TCMTB	[46]
	Mezcla de pesticidas	SPE	RP HPLC-MS	TCMTB	[47]
	Mezcla de pesticidas	SPE	HPLC-UV HPLC-MS GC-MS	TCMTB	[48]
Vino Italiano	Benzotiazoles	SPME	GC-MS	BT	[5]

SPE: extracción en fase sólida, SPME: micro-extracción en fase sólida, RP: fase inversa, HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, MS: detector por espectrometría de masas, UV: detector espectrofotométrico de UV, CE: electroforesis capilar, TLC: cromatografía en capa fina

En cuanto a los sistemas de detección, de la tabla anterior se observa que el más utilizado en las separaciones por HPLC y por CE fue el detector espectrofotométrico en la región ultravioleta. El detector por espectrometría de masas fue utilizado para separaciones por HPLC y por GC. En la Tabla 5 se resumen algunos límites de detección (LD) obtenidos en el análisis de los benzotiazoles.

Tabla 5. Límites de detección (LD) de algunas metodologías del análisis de benzotiazoles.

Técnica Analítica	Muestra	Benzotiazoles Encontrados	LD, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Ref.
GC-MS	Orina de ratas y humanos	MBT	20	[38]
HPLC-MS-MS	Agua superficial	BT	10-100	[43]
HPLC-MS	Agua de mar	TCMTB	1.0	[44]
HPLC-UV y MS		TCMTB	5.0	[45]
GC-MS	Vino Italiano	BT	45	[5]
HPLC-MS-MS	Aguas de desecho	BT, TCMTB y MTBT	2500	[49]

1.7 Selección de las técnicas analíticas para el estudio

En base a los resultados de la búsqueda bibliográfica y a los antecedentes del trabajo, las técnicas seleccionadas en la etapa del tratamiento de la muestra fueron la extracción con disolventes orgánicos y la extracción en fase sólida. Las técnicas de separación fueron la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Se utilizaron tres sistemas de detección: (1) detector espectrofotométrico, (2) detector electroquímico y (3) detector por espectrometría de masas. Además se llevaron a cabo los experimentos enfocados en la determinación del MBT por voltamperometría. A continuación se presentan de manera breve las técnicas mencionadas, haciendo énfasis en sus posibles ventajas y limitaciones en su aplicación al análisis de los compuestos de interés.

1.7.1 Extracción en fase sólida

La técnica de extracción en fase sólida (SPE) se basa en la adsorción selectiva de los compuestos de interés en la superficie de un sólido. La selectividad de la adsorción puede ser controlada y/o modificada por la selección apropiada de la fase sólida. Al poner en contacto una muestra líquida (o gaseosa) con un sólido, los compuestos que presentan cierta afinidad hacia este sólido se quedan fijos en su superficie. Posteriormente, la fase líquida puede ser eliminada y los compuestos de interés eluidos con un solvente adecuado. De esta

manera se obtiene una solución concentrada de los analitos (un pequeño volumen final respecto al volumen de muestra) y con una composición mucho menos compleja que la muestra inicial. La técnica SPE fue introducida en la química analítica en los años setenta del siglo pasado [50] y desde entonces sus aplicaciones se van incrementando, especialmente cuando se trata de simplificar la composición de la matriz de la muestra (“clean-up”) y en la preconcentración de los analitos para su posterior separación cromatográfica. Comúnmente, el sorbente sólido es elaborado en forma de partículas de tamaño 10–100 μm y está empacado en una jeringa, cartucho o en un disco. Después de la activación de la superficie del sorbente, se hace pasar cierto volumen de la muestra por el dispositivo y finalmente los compuestos de interés que se hayan fijado en la fase sólida se eluyen utilizando un sistema de disolventes. La separación se puede describir en cinco etapas:

- a) Acondicionamiento del sorbente sólido (solvatación de las alquil-cadenas para asegurar el mejor contacto con los compuestos durante etapa de adsorción).
- b) Activación de la superficie (con un disolvente seleccionado, dependiendo de tipo de sorbente sólido y de los compuestos a retener).
- c) Adsorción (pasando cierto volumen de muestra con una velocidad de flujo óptima).
- d) Lavado (eliminación de los compuestos contaminantes, que no fueron adsorbidos fuertemente en la superficie de la fase sólida y que pudieran interferir en el análisis).
- e) Elución de los compuestos retenidos en la fase sólida (con un pequeño volumen de un disolvente que presenta más alta afinidad hacia los compuestos respecto a los grupos funcionales de la fase sólida).

Obviamente, la selección del tipo de fase sólida y del sistema de los disolventes es el punto clave en cada una de las aplicaciones [50].

En cuanto a los tipos de sorbentes utilizados en SPE, estos pueden ser clasificados de manera semejante a las fases sólidas en cromatografía líquida: (i) fase normal, (ii) fase inversa y (iii) intercambiadores de iones. Los sorbentes utilizados como fase normal contienen grupos polares (Tabla 6) y exhiben alta afinidad a los compuestos polares. La fuerza de elución de los disolventes disminuye en el siguiente orden: agua > metanol > acetonitrilo > acetona, etc. Los intercambiadores de iones son los sorbentes que contienen grupos funcionales catiónicos o aniónicos (Tabla 6) y por tanto atraen los iones de carga

opuesta. En este caso, las propiedades mas importantes del disolvente utilizado en la elución son: el valor del pH y la fuerza iónica. En la mayoría de las aplicaciones de SPE se utilizan las fases sólidas basadas en partículas de sílice (en el caso de los cartuchos, el tamaño de partícula varia entre 40 y 80 μm). Para ello, los grupos silanol de la superficie son modificados introduciendo diferentes grupos funcionales, lo que permite controlar la afinidad de la superficie hacia diferentes grupos de compuestos (Tabla 6). Algunas otras fases inversas utilizadas en la técnica SPE son elaboradas en base a florisil, alúmina y polímeros macrorreticulares [50]. Este tipo de sorbentes presenta afinidad a los compuestos apolares y para la elución efectiva se requieren los disolventes apolares tales como hexano, isooctano, tolueno, etc.

Tabla 6. Clasificación de los sorbentes en SPE.[50]

	Grupo Funcional	Estructura Química
Fase Inversa	C1, metil	Si-CH ₃
	C8, octil	Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃
	C18, octadecil	Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
Fase Normal	Si, sílica	Si-OH
	CN, cianopropil	Si-(CH ₂) ₃ -CN
	2OH, diol	Si-(CH ₂) ₃ -O-CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH
Intercambio Ionico	SCX, ácido bencensulfónico	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₄ -SO ₃ ⁻
	DEA, dietilaminopropil amina terciaria	Si-(CH ₂) ₃ -NH ⁺ -(CH ₂ -CH ₃) ₂
	SAX, trimetilaminiopropil amina cuaternaria	Si-(CH ₂) ₃ -NH ⁺ -(CH ₃) ₃

Tomando en cuenta el carácter apolar de los benzotiazoles, es de esperar su retención efectiva en los cartuchos de fase inversa. Así, en la determinación de los pesticidas y sus metabolitos en agua de mar, se utilizaron los cartuchos poliméricos de fase inversa, obteniéndose mejor recuperación de los compuestos (incluyendo TCMTB) respecto a los cartuchos de grafito [47]. En otro trabajo, la separación/preconcentración de este tipo de compuestos se obtuvo en los cartuchos C18 [44]. Hinojosa [1] estudió la retención de TCMTB, MBT, BT, MTBT y MBO en cartuchos C18 y, utilizando las soluciones acuosas obtuvo recuperaciones en el rango 92.0–99.0%. En el presente trabajo, la extracción en fase sólida se utilizó en el análisis de aguas residuales por GC-MS, HPLC-UV y por voltamperometría.

1.7.2 Cromatografía líquida de alta resolución

A pesar del importante avance en las técnicas de química analítica, sus aplicaciones al análisis de mezclas y de muestras reales son limitadas generalmente por la falta de selectividad. En consecuencia, la mayoría de los procedimientos analíticos involucran una etapa de separación, previa a la etapa de medición de la señal analítica. En este contexto las técnicas cromatográficas en columna son sin duda las más utilizadas, ya que aseguran una buena resolución y son bastante versátiles. La cromatografía en columna puede ser definida como un método físico, basado en el uso de dos fases de ciertas propiedades fisicoquímicas: una estacionaria (que forma el relleno de la columna) y la segunda móvil (ésta pasa por la columna en una dirección y con cierta velocidad). Los compuestos a separar son introducidos a la columna junto con la fase móvil y la separación se basa en las diferencias entre la distribución de los compuestos en las dos fases. Así, durante el proceso cromatográfico las moléculas de cada uno de los solutos permanecen un lapso de tiempo solubilizadas en la fase móvil y otro lapso de tiempo enlazadas a la fase estacionaria. Las moléculas que exhiben mayor afinidad hacia la fase estacionaria, permanecen más tiempo enlazadas a esta fase respecto a los solutos con alta afinidad hacia la fase móvil. En consecuencia, el tiempo requerido por cada uno de los solutos para pasar por la columna es diferente y depende de las interacciones de estos compuestos con las dos fases. La elución de los compuestos de una columna se registra en forma de un cromatograma con ayuda de un sistema de detección. Gracias a la resolución de los compuestos, la selectividad de la técnica analítica utilizada en la detección deja de ser un punto crítico. De hecho, los detectores comerciales pueden dividirse entre los altamente selectivos (fluorimétrico, electroquímico, por espectroscopía de masas, etc.), de baja selectividad (espectrofotométrico) y no selectivos (conductimétrico).

Dependiendo de las propiedades de la fase móvil las técnicas cromatográficas se dividen de manera siguiente:

<u>Técnica</u>	<u>Fase móvil</u>
Cromatografía de gases	Gas inerte
Cromatografía de fluido supercrítico	Fluido de alta densidad, obtenido de un compuesto aplicando la temperatura y la presión por encima de los valores críticos
Cromatografía de líquidos	Líquido de baja viscosidad

La técnica más utilizada hasta la fecha en el análisis de los benzotiazoles es la cromatografía líquida, debido a que estos compuestos no son volátiles (Tabla 4). Dentro de esta técnica existe otra clasificación, que considera el tipo de interacciones entre los solutos y la fase estacionaria:

<u>Técnica de HPLC</u>	<u>Propiedades de los solutos que determinan la separación</u>
De reparto (fase normal o inversa)	Polaridad
De intercambio iónico	Carga eléctrica
Exclusión por el tamaño molecular	Tamaño molecular
De afinidad	Interacciones específicas

En el caso de HPLC en fase inversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Así que, los compuestos apolares son retenidos y, en consecuencia resueltos en la columna. En cuanto a los grupos funcionales, las fases estacionarias comunes en este tipo de cromatografía son las mismas que las enlistadas en la Tabla 6. A diferencia de los sorbentes SPE, la fase estacionaria para HPLC requiere un menor tamaño de partícula (3-10 μm) y un empacamiento de columna más compacto y homogéneo que en un cartucho, para lograr la separación de compuestos con características similares. Esto se debe a los efectos de resistencia a la transferencia de la masa en la columna. El carácter apolar de los compuestos orgánicos, considerados en el presente estudio justifica la selección de HPLC en fase inversa para su separación. Esta técnica también se ha utilizado por otros autores (Tabla 4).

Un punto importante en el desarrollo de un procedimiento cromatográfico es la selección de un sistema de detección. Las características de un detector cromatográfico ideal son las siguientes [51]:

- Respuesta lineal del detector a la creciente concentración o masa del soluto en el eluyente de la columna.
- Sensibilidad adecuada para una aplicación dada (el rango de sensibilidad de los detectores comerciales es de 10^{-8} a 10^{-15} g de soluto por segundo).
- Sensibilidad parecida para los compuestos de interés, o una respuesta predecible y selectiva para un solo soluto o una clase de solutos.
- Buena estabilidad y reproducibilidad de la respuesta.
- Amplio rango de linealidad de la respuesta (preferentemente varios ordenes de magnitud respecto a la concentración o masa del soluto).

- Tiempo de respuesta corto e independiente de la velocidad del flujo de la fase móvil.
- Carácter no-destrutivo (no destruye la composición de la solución).

Los detectores comercialmente disponibles se pueden clasificar en dos grupos: (1) aquellos cuya respuesta es relacionada con las propiedades de la fase móvil y que se modifican en la presencia de los solutos (detector refractométrico, conductométrico, etc.) y (2) aquellos cuya respuesta se basa en una propiedad del soluto (espectrofotométrico, fluorimétrico, electroquímico, etc.). Obviamente, ninguno de ellos cumple con todos requisitos de un detector ideal. La revisión bibliográfica realizada en el año 1982 reveló que el detector espectrofotométrico ha sido el más utilizado (71% de los trabajos publicados sobre aplicaciones de HPLC), seguido por el fluorimétrico (15%), refractométrico (5.4%) y el electroquímico (4.3%) [52].

1.7.2.1 Detección espectrofotométrica

En la detección UV/Vis se aprovechan las bandas de absorción molecular de los compuestos disueltos, en el rango espectral de la región ultravioleta y visible. El análisis cuantitativo se basa en la proporcionalidad entre la absorbancia a una longitud de onda seleccionada (λ) y la concentración del compuesto en la solución que pasa por el detector (ley de Beer). En los compuestos orgánicos insaturados, el fenómeno de absorción se relaciona principalmente con el desplazamiento de electrones π . En cada uno de los casos, la forma del espectro y su intensidad depende de la presencia de grupos cromóforos en la molécula. Por lo general, los compuestos orgánicos absorben fuertemente en la región de longitudes de onda menores de 220 nm y en estas condiciones, el detector UV pudiera considerarse como un detector sensible y universal (magnitud de la señal alta y parecida para diferentes compuestos). Sin embargo, no todos disolventes utilizados como componentes de la fase móvil son ópticamente transparentes en esta región. Además, el hecho de que mayoría de los compuestos presenta altos coeficientes de absorción molar en $\lambda < 220$ nm provoca alto ruido de la línea base. Finalmente, en el análisis de las muestras complejas, no siempre es posible lograr la resolución de todos los compuestos y, con el uso de un detector universal existe un alto riesgo de solapamiento de los picos cromatográficos. Al aumentar la selectividad del detector hacia los solutos de interés, éste se queda “ciego” a los interferentes, lo que permite registrar picos limpios de los analitos, aun cuando su

separación de los interferentes en la columna no es completa. En consecuencia, la detección se lleva a cabo en las condiciones de compromiso; utilizando la región de longitudes de onda mayores, donde aumenta la selectividad, pero sacrificando la sensibilidad de la respuesta.

En la estructura de cada uno de los compuestos seleccionados para este estudio (los benzotiazoles, MBO (Figura 7) y PCF (Figura 6) se encuentran varios grupos cromóforos y las longitudes de onda de detección reportadas en la literatura varían entre 220 nm y 328 nm [2, 31, 39-41].

Las condiciones de detección utilizadas anteriormente, fueron 280 nm para TCMTB, BT, MTBT, MBO y 324 nm para MBT [1]. En el análisis de aguas residuales, se observó la elución de varios compuestos presentes en la muestra, que no fueron eliminados durante la etapa de SPE. Debido a las interferencias de matriz (sobre todo la co-elución de los interferentes con el estándar interno MBO), la sensibilidad de la determinación de todos los analitos disminuyó respecto a la sensibilidad obtenida para la solución sintética y la cuantificación se llevó a cabo por el método de adición de estándar.

Los procedimientos por cromatografía líquida incluyen frecuentemente una etapa de derivatización química de los solutos: antes de introducir la muestra en la columna, o en la salida de la columna. La derivatización de uno o más analitos ofrece las siguientes ventajas:

- Disminución de la polaridad del soluto para poder llevar a cabo la separación en fase inversa con mayor retención en la columna y, en consecuencia mejor resolución con respecto a los compuestos no derivatizados.
- Aumento de la estabilidad del analito.
- Aumento de la magnitud de respuesta del detector para todos los solutos de interés (mejor sensibilidad).
- Aumento de la magnitud de la respuesta para uno, ó algunos, pero no todos los componentes de la muestra (mejor selectividad y sensibilidad).

En base a estos antecedentes que se acaban de presentar, uno de los enfoques de este trabajo fue afinar el procedimiento cromatográfico desarrollado anteriormente para poder llevar a cabo la cuantificación de TCMTB, MBT, BT, MTBT y PCF en aguas residuales utilizando el MBO como estándar interno. Se propuso la derivatización pre-columna de los benzotiazoles con el reactivo 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl), ya que se ha

reportado que éste reacciona con el grupo funcional –SH de varios compuestos formando derivados fluorescentes [53]. El objetivo de esta modificación fue obtener mejor resolución cromatográfica y aumentar la selectividad y sensibilidad de la detección.

1.7.2.2 Detección electroquímica

A pesar de que la técnica HPLC es una herramienta de separación muy potente, no siempre es posible obtener la resolución de los compuestos que presentan propiedades fisicoquímicas similares. Como ya se ha mencionado, este problema puede resolverse utilizando un sistema de detección selectivo, que responda solamente a cierto tipo de compuestos. Otra de las limitaciones de HPLC es la necesidad de detectar y cuantificar cada uno de los solutos en los pequeños volúmenes de la solución que sale de la columna. Por ello, son preferibles los detectores altamente sensibles, que fácilmente pueden ser adaptados a un sistema en flujo y que presentan cierta selectividad. Varias técnicas electroanalíticas cumplen con estos requisitos. Entre éstas, destacan las técnicas voltamperométricas que ofrecen excelente sensibilidad, pero cuya moderada selectividad limita sus aplicaciones en el análisis de muestras complejas. Así que, el acoplamiento entre HPLC y la voltamperometría permite extender las posibilidades y el rango de aplicaciones de cada una de estas técnicas.

De manera general, los detectores electroquímicos se clasifican dependiendo de la propiedad que se está midiendo:

<u>Señal analítica</u>	<u>Tipo de detector</u>
Capacitancia	Detector de la constante dieléctrica
Resistencia	Detector de la conductividad
Voltaje	Detector potenciométrico
Corriente	Detector coulométrico
	Detector polarográfico
	Detector amperométrico

Todos los detectores voltamperométricos se basan en la producción de la corriente eléctrica, causada por la oxidación o reducción de la especie electroactiva (soluta saliendo de la columna HPLC) en la superficie de un electrodo, al que se aplica un potencial apropiado. La alta selectividad del detector se debe al hecho de que el fenómeno de oxidación/reducción ocurre a un potencial específico, dependiendo de los grupos funcionales en la estructura del compuesto electroactivo [54]. En relevancia a este estudio

cabe aclarar que, el término “detector amperométrico” se refiere a un grupo de los detectores voltamperométricos, donde el electrodo de trabajo es sólido (carbón vítreo o un metal noble). En el caso más simple, a este electrodo se aplica un potencial constante, adecuado para lograr la oxidación o reducción del analito. La magnitud de la corriente eléctrica producida en la celda se toma como la señal analítica. En los detectores amperométricos más recientes el potencial es aplicado en forma de pulsos, lo que facilita la limpieza y renovación de la superficie del electrodo de trabajo. Existen varios diseños comerciales de las celdas electroquímicas, pero independientemente del diseño, la celda de detector consiste en tres electrodos (de trabajo, de referencia y auxiliar) con un volumen pequeño ($< 20 \mu\text{l}$), significativamente inferior en comparación con el volumen de banda cromatográfica (aprox. 0.3 ml). Tomando en cuenta la composición del eluyente de una columna HPLC, la fase móvil actúa como el electrolito soporte en la celda del detector. Esto a su vez causa las siguientes limitaciones al momento de seleccionar la composición de la fase móvil más adecuada para la separación cromatográfica:

- La concentración de un electrolito en la fase móvil en el rango $0.010 - 0.10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$,
- La constante dieléctrica del solvente suficientemente alta para permitir la ionización del electrolito,
- Fase móvil electroquímicamente inerte bajo las condiciones de potencial aplicadas en la detección.

En consecuencia, la detección electroquímica es particularmente compatible con las técnicas de fase inversa y de intercambio iónico. Además, las aplicaciones son limitadas a las separaciones cromatográficas isocráticas, ya que los cambios de composición de la fase móvil (electrolito soporte) durante el gradiente provocan cambios drásticos de la línea base. La detección amperométrica en la modalidad oxidativa ha sido ampliamente utilizada en el análisis de fenoles, aminas aromáticas, tioles, compuestos heterocíclicos, etc. [55]. La electroactividad de los compuestos orgánicos insaturados se debe al hecho de que sus estructuras electrónicas tienden a estabilizar los radicales libres que se forman como productos intermedios de su oxidación en el ánodo. Así que, la barrera de activación de esta reacción es baja favoreciendo la cinética [55]. A pesar de que, a un potencial adecuado, la oxidación de compuestos orgánicos sin electrones π en su estructura es termodinámicamente favorecida, estos compuestos no son electroactivos debido a la lenta

cinética de la oxidación. En este caso, se pueden utilizar los electrodos de propiedades catalíticas, preferentemente de los metales nobles, cuyos orbitales d son insaturados.

En la revisión bibliográfica se encontraron varias aplicaciones de HPLC con detección electroquímica en el análisis de los compuestos de azufre, incluyendo sulfuros, disulfuros, tioles, tioéteres, tiocarbamatos, etc. [55]. Un importante número de trabajos fue dedicado a la determinación de los compuestos biológicamente activos y, en específico a la determinación de amino ácidos (cisteína, metionina, cistina) [56-58] y glutatona [59]. En un artículo reciente, White y col. presentaron el estado de arte en la detección electroquímica de tioles, con énfasis en la glutatona, cisteína y homocisteína [60]. El procedimiento más simple ha sido la oxidación directa del grupo $-SH$ en la superficie del electrodo de carbon vítreo [61, 62], de platino [63], oro [64-66] y plata [67] utilizando el potencial constante. Sin embargo, bajo estas condiciones se presenta el problema de pasivación de la superficie del electrodo por la adsorción del analito [60]. Otros autores utilizaron la detección electroquímica de pulsos para evitar la pasivación del electrodo [68-70]. El ciclo de un pulso generalmente consiste en las siguientes etapas:

- Potencial oxidativo relativamente alto por un corto tiempo con el fin de limpiar la superficie del electrodo
- Un potencial reductivo para eliminar los óxidos formados y de esta manera reactivar la superficie
- Aplicación de un potencial adecuado para la oxidación selectiva de tioles de interés.

Cabe mencionar que, debido a su falta de selectividad, la detección electroquímica no puede ser utilizada para el análisis directo de mezclas de compuestos de azufre. Sin embargo, en acoplamiento con la separación cromatográfica se reportaron excelentes límites de detección para los compuestos individuales: $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ glutatona en cabello [69] y $6 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ cistina [64].

Una parte del presente estudio tiene el enfoque a la determinación del fungicida TCMTB y sus posibles metabolitos en aguas residuales y en orina de los trabajadores expuestos a este fungicida. Para ello y en base a la revisión bibliográfica realizada, la detección electroquímica fue seleccionada como una alternativa para cuantificar estos compuestos después de su separación por HPLC en fase inversa. Hasta la fecha existe solamente un reporte sobre la determinación de TCMTB y MBT (principal metabolito) en

orina. En el trabajo citado se obtuvieron los derivados volátiles de los dos compuestos y el análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas [38]. La única especie detectada en las orinas de los individuos expuestos fue el MBT. Por ello, en el presente trabajo se consideraron dos tioles: el mercaptobenzotiazol y el mercaptobenzoxazol (estándar interno). La aplicación propuesta podría bajar los límites de detección en la cuantificación, además de que el procedimiento HPLC-ED ofrece la ventaja de simplicidad y bajo costo de análisis.

1.7.3 Voltamperometría

El fenómeno de la adsorción de ciertos compuestos orgánicos en la superficie de un electrodo de mercurio a potencial cero ha sido utilizado para fines analíticos por varios autores [71]. Después de un tiempo de depositación del analito en el electrodo, éste puede ser rediseuelto mediante el proceso de oxidación o reducción, estimulado por la aplicación de un potencial adecuado. La ventaja importante de la voltamperometría de redisolución es que, utilizando un tiempo considerablemente largo en la etapa de depositación se obtiene la preconcentración selectiva del analito y, en consecuencia una mejor sensibilidad de la determinación. En la revisión bibliográfica se encontraron varias aplicaciones de la técnica de voltamperometría adsorptiva de redisolución catódica en la determinación de compuestos orgánicos no electroactivos que, al formar quelatos con los iones metálicos pueden ser convertidos en especies electroactivas [72, 73]. Uno de los compuestos estudiados ha sido el MBT, para el cual las formas electroactivas fueron sus complejos (o sales) con iones de cobalto, níquel, mercurio y cobre [72, 74, 75]. En este laboratorio se desarrolló un procedimiento voltamperométrico para su posible aplicación en la determinación de MBT en licores de curtido después de extracción con acetato de etilo. Para ello se estudiaron varios parámetros experimentales, encontrándose una mejor sensibilidad en presencia del ion cobre (10:1 respecto al MBT), así como el efecto benéfico de la presencia de una baja concentración de un modificador orgánico y de un surfactante no iónico. Las características analíticas evaluadas en la técnica de onda cuadrada permitieron establecer el rango útil de trabajo entre 5.0 y 70.0 nmol·l⁻¹. Sin embargo, en el análisis de muestras reales se observó una fuerte supresión de la señal en presencia de acetato de etilo, requerido en la etapa de extracción del MBT del licor de curtido. Otra alternativa para la determinación del MBT por

voltamperometría adsortiva, fue la formación de la onda catalítica de protones [1]. Se demostró que, a pH ácido el MBT presenta cierta actividad catalítica, adscribiendo este efecto a la capacidad de enlazar el protón a través del par electrónico libre en la molécula de MBT. La formación de la onda catalítica de protones se presenta esquemáticamente en la Figura 9.

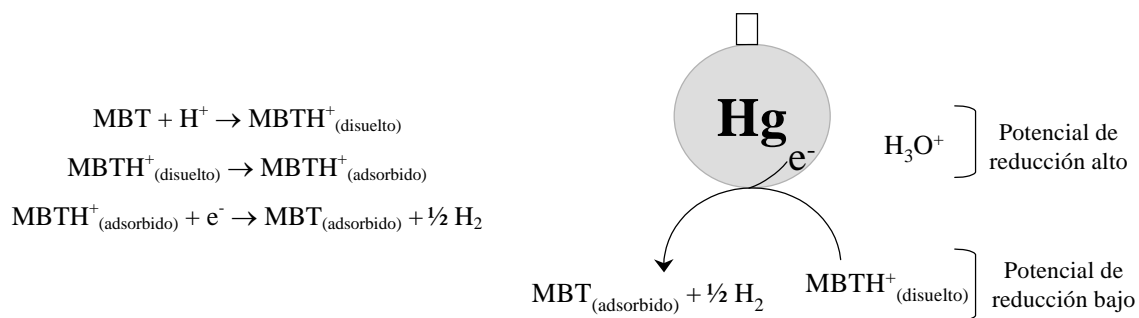


Figura 9. Formación de la onda catalítica de protones.

De esta manera, la presencia del MBT provoca una disminución del sobrepotencial de la reducción de protón, siendo la magnitud de la señal voltamperométrica directamente proporcional a la concentración del MBT en la solución [76, 77]. En presencia de ácido fosfórico (80.0 mmol·l⁻¹) y utilizando la técnica de onda cuadrada se obtuvo una mejor sensibilidad en la determinación del MBT con respecto al procedimiento donde la especie electroadsortiva fue el MBT-Cu (15 nA·l·nmol⁻¹ frente 3.2 nA·l·nmol⁻¹). Por otro lado, el procedimiento basado en el proceso catalítico fue más susceptible a las interferencias provocadas por el solvente utilizado en la etapa de extracción y por la presencia de otros componentes de la muestra, que pudieran ser extraídos del licor de curtido bajo las mismas condiciones [1]. Estos resultados confirmaron los reportes sobre otras aplicaciones de las corrientes catalíticas, donde se observó una alta sensibilidad a los cambios de temperatura, de pH y supresión en presencia de diferentes compuestos, incluyendo surfactantes [78]. A pesar de las limitaciones de las corrientes catalíticas que se acaban de mencionar, esta alternativa parece muy atractiva debido a que la magnitud de la señal es significativamente más alta con respecto a las corrientes de difusión:

$$I_{\text{catalíticas}} \gg I_{\text{difusión}}$$

Tomando en cuenta que se presenta una muy buena sensibilidad de la determinación del MBT por voltamperometría adsorptiva de redisolución catódica con formación de onda catalítica de protones, en este trabajo se continuó con los estudios sobre su posible aplicación en el análisis de muestras medio ambientales. Basándose en los resultados obtenidos anteriormente, se estudió el efecto de una serie de parámetros que pudieran disminuir o eliminar las interferencias observadas.

1.7.4 Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas

Los principios generales de la cromatografía de gases (GC) son muy similares a los de cromatografía de líquidos en columna (sección 1.7.2) con la diferencia que la fase móvil es un gas inerte que no interacciona con los solutos. Así, en la cromatografía de gases, los solutos son distribuidos entre la fase estacionaria (líquido inmovilizado en un soporte sólido) y el gas inerte, cuya única función es la de transportar los compuestos en la columna. La separación se obtiene gracias a las diferencias en la volatilidad y polaridad de los solutos. En consecuencia, la técnica GC tiene aplicaciones en el análisis de los compuestos orgánicos e inorgánicos que son volátiles y térmicamente estables.

El sistema de introducción de la muestra permite la inyección directa de muestras gaseosas o incluye una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de columna. Entre las cuales se pueden mencionar los métodos de la cabeza gaseosa (headspace) y de purga y trampa [79].

A diferencia de las columnas en cromatografía líquida, las columnas en GC son mucho más largas (de 2 hasta 100 m) y se pueden clasificar como las empacadas (rellenas) y las tubulares abiertas (capilares). Las columnas de relleno son relativamente cortas (aprox. 3 m) y tienen diámetro interno de 2 a 4 mm. El relleno es un sólido inerte de tamaño de partícula entre 150 y 250 μm , recubierto con una capa fina (0.05 – 1 μm) de la fase estacionaria líquida. Las columnas capilares abiertas son más largas (hasta 100 m) y pueden tener la fase líquida inmovilizada sobre la pared del capilar o sobre el soporte que forma un recubrimiento de la pared. En el último caso, una muy fina capa del recubrimiento (30 μm , usualmente tierra de diatomeas) permite aumentar la cantidad de la fase estacionaria en la columna y, en consecuencia una mayor capacidad de carga. En la Tabla 7 se resumen las

propiedades y características de las columnas utilizadas en las separaciones GC, donde se puede observar como el diseño de la columna afecta los parámetros de separación.

Tabla 7. Propiedades y características de las columnas para cromatografía de gases [80].

Parámetro	Tipo de columna			
	FSOT	WCOT	SCOT	Relleno
Longitud, m	10-100	10-100	10-100	1-6
Diámetro interno, mm	0.1-0.53	0.25-0.75	0.5	2-4
Eficacia, platos/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Tamaño de la muestra, ng	10-75	10-1000	10-1000	10-10 ⁶
Presión relativa	baja	baja	baja	alta
Velocidad relativa	rápida	rápida	rápida	lenta
Inactividad química	mejor ----- > peor			

FSOT – columna capilar de sílice fundida, WCOT – columna capilar de pared recubierta, SCOT – columna capilar con soporte recubierto

En cuanto a la fase estacionaria, las propiedades deseables incluyen su baja volatilidad y alta estabilidad térmica, los líquidos deben ser químicamente inertes y presentar características que aseguren buena separación de los solutos. Entre las fases más comunes se pueden mencionar en orden de polaridad creciente: polidimetil siloxano, poli(fenilmetildifenil) siloxano, poli(fenilmetil) siloxano y polietilenglicol.

Las separaciones por GC requieren de una temperatura elevada (por encima de los puntos de ebulición de los solutos) y, en la mayoría de los casos se llevan a cabo en un gradiente de temperatura, por lo que la columna está colocada en un horno con posibilidad de programar y controlar la temperatura.

Entre los sistemas de detección utilizados en cromatografía de gases, en las últimas décadas destaca el uso de la espectrometría de masas. El acoplamiento entre estas dos técnicas es bastante simple ya que en la mayoría de los casos tanto la composición de la fase gaseosa saliendo de la columna como su caudal permiten la introducción directa del eluyente a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. Uno de los analizadores de masas utilizado en GC-MS es la trampa de iones. En este diseño, los iones en estado gaseoso son generados por impacto de electrones o por ionización química y posteriormente almacenados por la acción de campo electromagnético (trampa iónica). Luego, los iones son expulsados de la trampa de tal manera, que se lleva a cabo un barrido en función del cociente masa/carga (m/z) y transportados hacia un detector de iones. Las ventajas más importantes del sistema GC-MS son su alta selectividad y sensibilidad de

separación/detección, así como la posibilidad de caracterizar los solutos basándose en el espectro de masas obtenido.

Muy frecuentemente, el procedimiento analítico por GC involucra una etapa de derivatización pre-columna, cuyos objetivos pueden ser: (1) mejorar la estabilidad térmica de los compuestos de interés, (2) modificar la volatilidad y/o polaridad de los solutos para obtener una mejor resolución, (3) convertir los compuestos no volátiles en sus derivados volátiles e (4) introducir a la molécula un grupo marcador dirigido al detector. Cabe mencionar que, en el análisis de muestras complejas, la volatilización de los compuestos de interés presenta una ventaja adicional, ya que se obtiene separación de los analitos de otros componentes de la matriz. Existe una serie de requisitos que debería cumplir la reacción química para su aplicación en derivatización pre-columna. Entre otros, la reacción debería ser cuantitativa y de cinética rápida, pudiéndose introducir la mezcla de reacción directamente en la columna y obteniéndose la resolución del exceso del reactivo de los solutos derivatizados. Obviamente, no siempre se cumplen todos estos requisitos, en la mayoría de los casos el procedimiento pre-columna incluye etapas adicionales tales como eliminación del exceso de reactivo, cambio del disolvente, etc. Un ejemplo típico es la reacción con los agentes sililantes (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida u otros) que convierten un hidrógeno activo de grupos polares (-OH, COOH, -NH₂, =NH, -SH) en un grupo -O-Si(CH₃)₃. La Tabla 8 presenta los tres principales métodos de derivatización en GC.

Tabla 8. Reacciones de derivatización comúnmente utilizadas en GC.

Método	Reactivos típicos de derivatización	Compuesto a derivatizar	Derivados
Acilación	Anhídrido trifluoroacético, TFAA Anhídrido pentafluoropropiónico, PFAA Anhídrido heptafluorobutírico, HFAA	R-OH R-SH R-NH ₂ R ₂ -NH	R-O-CO-R' R-S-CO-R' R-NH-CO-R' R ₂ -N-CO-R'
Alquilación	N, N-dimetilformamidadimetilacetal , DMFDA Pentafluorobencilbromuro, PFBB Hidróxido de trimetilanilinio, TMAH	R-OH R-SH R-COOH R-NH ₂	R-O-R' R-S-R' R-COO-R' R-NH-R'
Sililación	Hexametildisilazano, HMDS N, O-bis(trimetilsilil)acetamida, BSA N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, BSTFA	R-OH R-COOH R-NH ₂ R ₂ -NH R-CO-NH ₂	R-O-Si(CH ₃) ₃ R-COO- Si(CH ₃) ₃ R-N-[Si(CH ₃) ₃] ₂ R ₂ -N-Si(CH ₃) ₃ R-CO-N-[Si(CH ₃) ₃] ₂

En la revisión bibliográfica se encontraron varias aplicaciones de la cromatografía de gases en el análisis de benzotiazoles (Tabla 4). Así, en el análisis de TCMTB y de MBT en orina Manninen y col. [38] utilizaron pentafluorobencilbromuro (PFBB) para convertir los analitos en sus respectivos tioéteres antes de su introducción en la columna GC. Por otro lado, ha sido reportado [81] que el mismo reactivo pudiera ser utilizado en la derivatización de alcoholes, ácidos, tioles y aminas de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 10:

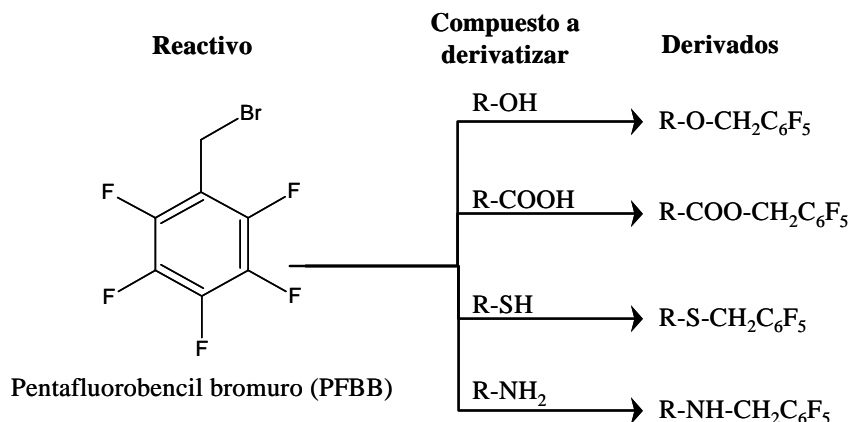


Figura 10. Reacciones de derivatización pre-columna del pentafluorobencilbromuro con diferentes grupos funcionales.

Considerando la estructura química de los compuestos de interés para este estudio (los benzotiazoles y el pentaclorofenol), el PFBB ha sido seleccionado como reactivo derivatizante para las pruebas de análisis de aguas de desecho por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar nuevas metodologías analíticas para la determinación de los funguicidas utilizados en el tratamiento de las pieles en la industria curtidora (2-[tiocianometil]tiol]-benzotiazol, así como sus posibles productos de degradación y el pentaclorofenol) en muestras medio ambientales y clínicas.

2.2 Objetivos específicos

Con el fin de lograr el objetivo anterior se definieron los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollar el procedimiento por cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotométrica para la determinación del 2-[(tiocianometil)tiol]-benzotiazol (TCMBT), 2-mercaptobenzotiazol (MBT), benzotiazol (BT), metiltiobenzotiazol (MTBT) y pentaclorofenol (PCF) en aguas de desecho.
2. Desarrollar el procedimiento por cromatografía líquida de alta resolución con detección amperométrica para la determinación del MBT en muestras medio ambientales y clínicas.
3. Avanzar en el estudio sobre la posible aplicación de la voltamperometría adsorbtiva de redisolución catódica con onda catalítica de protones en la determinación de MBT en aguas de desecho.
4. Aplicar el pentafluorobencilbromuro (PFBB) como reactivo derivatizante para la determinación de los compuestos seleccionados por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.

Capítulo 3. Parte Experimental

3.1 Instrumentos

1. Espectrofotómetro Spectronic 3000 con arreglo de diodos (resolución 0.35 nm, Milton Roy), equipado con el paquete de software User Data, v. 2.01 de Milton Roy, Inst. Co.
2. Cromatógrafo de líquidos (modelo 1050, Hewlett Packard) con detector espectrofotométrico de onda múltiple y detector fluorimétrico programable (modelo 1046A), ambos controlados por el paquete de software ChemStation.
3. Bomba CLAR (modelo PM-80) con desgasificador de vacío modelo 2C-26B y detector amperométrico EPSILON (Bioanalytical System, Inc.). El equipo es controlado por un paquete de software Chromgraph 2.34.00 (Bioanalytical System Inc.). El detector amperométrico está acoplado a una celda de flujo CC-5 de volumen 0.3 μl con electrodos de trabajo de Au (28 mm^2) y carbón vítreo (28 mm^2 y 113 mm^2). El electrodo de referencia es Ag/AgCl y el electrodo auxiliar de acero inoxidable 316.
4. Cromatógrafo de gases modelo CP3800 (Varian Chrompack) acoplado a un detector de masas modelo Saturn 2000 (Varian Chrompack) controlado por el software Saturn GC/MS Workstation v. 5.51.
5. Potenciostato Metrohm 693 VA Processor. Electrodo de trabajo de Hg, electrodo de referencia Ag/AgCl y electrodo auxiliar de Pt.
6. Potenciostato EG&G Princeton Applied Research Modelo 270/250 controlado por el paquete de software Research Electrochemistry v. 4.30.
7. Microcentrífuga Denver Instrument.
8. Vortex Genie 2.
9. Potenciómetro Corning (313 pH/temperatura).
10. Purificador de agua (calidad de agua MilliQ); Labconco Water PRO PS.

3.2 Software

Grams/32, versión 5.01 (Galactic Industries Corporation, E.U.A).

Grapher versión 1.27 (Golden Software, E.U.A.).

Hoja de cálculo y procesador de textos (Microsoft office2000).

3.3 Equipo y material de laboratorio

Frascos de polietileno 1000 ml (Fisher).

Tubos Eppendorff 1.5 ml.

Gradilla para tubos Eppendorff.

Tubos Falcon 50 y 15 ml.

Matraz volumétrico 1000 ml (Baxter Scientific Products).

Micropipetas Eppendorff 0.5-10 μl , 20-200 μl y 200-1000 μl .

Cartuchos SepPak-Plus C18 (Waters).

Columnas analíticas Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 μm) y C18 Kromasil 100 (250 mm x 4.6 mm x 5 μm).

Columna para GC-MS CP-SIL 8CB/MS 30 m x 0.25 mm con un grosor de fase estacionaria de 0.25 μm .

3.4 Reactivos, disoluciones y muestras

Todos los solventes utilizados fueron de calidad cromatográfica, la pureza de los reactivos fue grado analítico y se utilizó agua desionizada (18.2 M Ω cm) del sistema de purificación de agua Labconco.

Para todas las técnicas se prepararon disoluciones patrón en acetonitrilo del 2-mercaptobenzoxazol (MBO), 2-mercaptobenzotiazol (MBT), 2-[(tiocianometil)tiol]-benzotiazol (TCMBT), metiltiobenzotiazol (MTBT), benzotiazol (BT) y pentaclorofenol (PCF) con una concentración de 1.0 g·l⁻¹. Todos los reactivos anteriores fueron adquiridos en Sigma, excepto TCMTB que fue proporcionado por Buckman Laboratories Inc. Las disoluciones de trabajo (1.0 mg·l⁻¹ en acetonitrilo) de dichos compuestos se prepararon diario.

3.4.1 Determinación por HPLC con detección espectrofotométrica

El ácido acético fue de reactivos Sigma.

El acetonitrilo grado HPLC fue de J.T. Baker Chemicals.

3.4.2 Determinación por HPLC con detección espectrofotométrica previa derivatización precolumna con NBD-Cl

El buffer de carbonatos ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7.7) fue preparado utilizando reactivos Sigma.

La solución de NBD-Cl ($0.10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en acetato de etilo) se preparó usando reactivos Sigma.

El acetato de etilo fue de J.T. Baker Chemicals.

3.4.3 Determinación por HPLC con detección amperométrica

Se utilizaron las disoluciones de los siguientes reactivos Sigma: ácido acético, ácido fosfórico, ácido monocloroacético, hidróxido de sodio y EDTA.

El acetonitrilo grado CLAR y cloruro de metileno fue de J.T. Baker Chemicals.

3.4.4 Determinación por voltamperometría adsortiva de redisolución catódica

El ácido trifluoroacético, TFA (10.0 %) y el ácido fosfórico fueron de Sigma.

El acetonitrilo grado CLAR y cloruro de metileno fue de J.T. Baker Chemicals.

3.4.5 Determinación por cromatografía de gases con detector por espectrometría de masas

El hidróxido de tetrabutilamonio ($0.080 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) y el tampón de fosfatos ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8.0) fue preparado a partir de reactivos Sigma.

La solución de bromuro de pentafluorobencilo (1.0%) en etanol fue preparado a partir de reactivos Sigma.

El acetato de etilo y el etanol fue de J.T. Baker Chemicals.

3.5 Muestras Utilizadas en este estudio

La muestra agua de desecho municipal de León fue proporcionada por la Comisión de Agua y Saneamiento del Estado de Guanajuato.

Las muestras de orina de trabajadores expuestos al fungicida TCMTB fueron proporcionadas por el Dr. Carlos Konhauser (Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Guanajuato).

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Este estudio está enfocado al desarrollo de herramientas analíticas que pudieran ser útiles en la evaluación del impacto medio ambiental generado por el uso de fungicidas en la industria curtidora en León, Gto. En actualidad, el fungicida más utilizado en la protección de pieles parcialmente tratadas es el TCMTB, que puede degradarse en el medio formando compuestos más tóxicos con respecto al fungicida mismo (MBT, MTBT, BT). Por otra parte, no se puede despreciar el uso anterior del pentaclorofenol (PCF), ya que este compuesto organoclorado es altamente tóxico y persistente en el medio ambiente. Para lograr los objetivos definidos, en el desarrollo del trabajo se utilizaron diferentes sistemas químicos, técnicas de tratamiento de muestras, de separación y de detección. En la Tabla 9 se presentan sistemáticamente las matrices químicas estudiadas, los compuestos determinados y las etapas claves en los procedimientos analíticos, haciendo referencia a la sección de este capítulo donde se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 9. Compuestos seleccionados, sistemas químicos y estrategias analíticas propuestas para el estudio.

Matriz química	Analitos	Pre-tratamiento	Técnica analítica	Sección
Agua de desecho	TCMTB, MBT, BT, MTBT, PCF	SPE	HPLC, fase inversa, Detección UV-Vis	4.1
Solución modelo	TCMTB, MBT, BT, MTBT, PCF	Derivatización Extracción liq-liq	HPLC fase inversa, Detección UV-Vis	4.1.1
Agua de desecho Orina	MBT	Extracción liq-liq	HPLC, fase inversa, Detección amperométrica	4.2
Agua de desecho	MBT	SPE	Voltametría adsortiva de redisolución catódica	4.3
Agua de desecho	TCMTB, MBT, BT, MTBT, PCF	SPE Derivatización	GC-MS	4.4

Es necesario resaltar que el uso de las herramientas electroanalíticas fue restringido al análisis del MBT, debido a que es un compuesto estable y presenta electroactividad bajo condiciones adecuadas. Por otra parte, el MBT fue reportado como el principal producto de degradación del TCMTB en muestras ambientales por varios autores (Tabla 4). Su presencia fue también detectada en la orina de individuos expuestos al TCMTB, lo que justifica la necesidad de poner a punto los procedimientos analíticos adecuados para la cuantificación de este compuesto particular, considerándolo como un tipo de índice de contaminación con el fungicida TCMTB.

4.1 Análisis del fungicida TCMTB, sus productos de degradación y del PCF por HPLC con detección espectrofotométrica

La primera etapa del estudio fue la selección de las condiciones cromatográficas por HPLC en fase inversa para lograr la resolución de los fungicidas TCMTB y PCF, los productos de degradación del TCMTB (MBT, BT, MTBT) y el MBO como un posible estándar interno. En el desarrollo experimental se tomaron como base las condiciones de separación y detección reportadas anteriormente [1] y se utilizó una solución de los estándares conteniendo $0.050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO y MBT, $0.20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de BT, $0.10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de TCMTB y MTBT y $1.0 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de PCF en acetonitrilo. Esta disolución fue introducida al sistema cromatográfico variando sistemáticamente la composición de la fase móvil (tipo y concentración del ácido, porcentaje del modificador orgánico) y las condiciones de elución. En cuanto a la detección espectrofotométrica, se adoptaron las condiciones utilizadas en el estudio anterior, ya que el compuesto adicionado en este estudio (pentaclorofenol) presenta alto coeficiente de absortividad molar en la región de 280 nm. Hinojosa separó la mezcla de TCMTB, MBT, BT, MTBT y MBO en 9 minutos, utilizando la elución isocrática con acetonitrilo: 0.10% ácido trifluoroacético (80:20). En este trabajo se obtuvo una buena separación y tiempos de retención más cortos con una cantidad menor de acetonitrilo (66%) y utilizando una baja concentración de un ácido menos contaminante (0.020 % ácido acético). Las condiciones cromatográficas seleccionadas y el cromatograma típico de los estándares se presentan en la Tabla 10 y en la Figura 11.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas seleccionadas para la separación del TCMTB, MBT, BT, MTBT, PCF y MBO por HPLC en fase inversa.

Columna	Hypersil ODS 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm
Fase móvil	0.020% Ácido acético (pH 3.7) : Acetonitrilo (34:66)
Volumen de inyección	20 μl
Elusión	Isocrática
Flujo	1.2 ml min^{-1}
Detección	$\lambda_{\text{anal}}=280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ref}}=400 \text{ nm}$, $\delta=60\text{nm}$ - MBO, BT, TCMTB, MTBT, PCF $\lambda_{\text{anal}}=324 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ref}}=380 \text{ nm}$, $\delta=60\text{nm}$ - MBT

δ - rendija

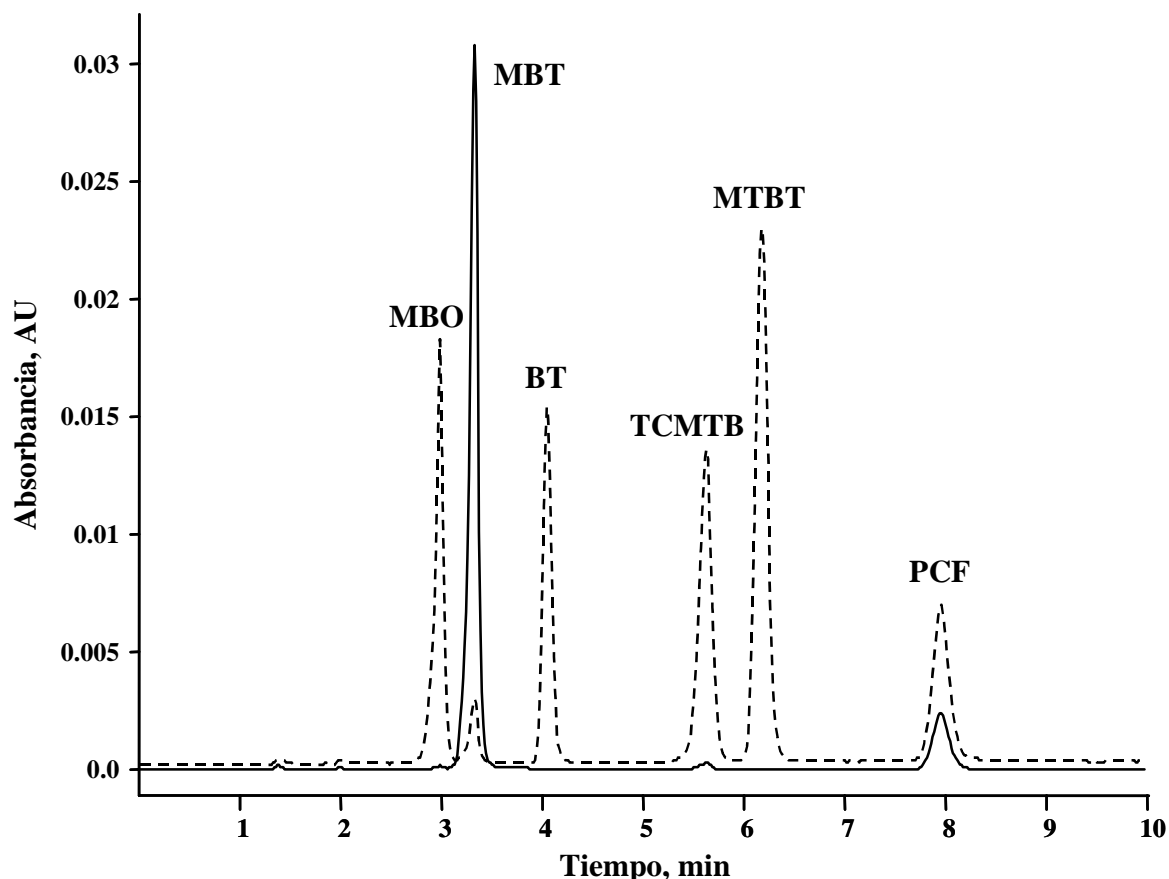


Figura 11. Cromatograma típico de la mezcla de los estándares ($0.80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO y MBT, $3.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BT, $1.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TCMTB, $1.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MTBT y $16.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de PCF) obtenido por HPLC en fase inversa con detección en (----) 280 nm y (—) 324 nm (condiciones cromatográficas en Tabla 10).

Una vez definidas las condiciones cromatográficas, se realizó el proceso de calibración utilizando siete soluciones de los estándares en acetonitrilo, cada una conteniendo seis compuestos de interés. Las concentraciones de los estándares fueron: $0.050, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO y MBT; $0.20, 0.40, 0.80, 1.6, 3.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BT; $0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de TCMTB; $0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MTBT; y $1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ PCF. En la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos, que permiten utilizar el procedimiento propuesto para los fines cuantitativos (cortos tiempos de retención, altos coeficientes de regresión lineal y bajos valores de los errores estándar).

Tabla 11. Parámetros evaluados en el proceso de calibración para el TCMTB, MBT, MBO, BT, MTBT y PCF por HPLC en fase inversa.

Parámetro	Compuestos de interés					
	MBO	MBT	BT	TCMTB	MTBT	PCF
λ_{anal} , nm	280	324	280	280	280	280
t_{ret} , min	2.98	3.32	4.05	5.62	6.17	7.94
Función de calibración	$(4.38x+4.84)10^{-2}$	$(3.90x+7.69)10^{-2}$	$(10.5x+0.94)10^{-2}$	$(19.5x+1.63)10^{-2}$	$(28.5x+2.81)10^{-2}$	$(10.0x+0.08)10^{-2}$
r^2	0.9994	0.9999	0.9998	0.9998	0.9996	0.9995
SD del intercepto	$14.7 \cdot 10^{-2}$	$3.53 \cdot 10^{-2}$	$7.88 \cdot 10^{-2}$	$6.86 \cdot 10^{-2}$	$15.3 \cdot 10^{-5}$	$4.88 \cdot 10^{-5}$
SD de la pendiente	$6.37 \cdot 10^{-4}$	$1.53 \cdot 10^{-4}$	$8.54 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^{-1}$	$3.32 \cdot 10^{-4}$	$1.06 \cdot 10^{-8}$
LD, $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	0.60	0.40	2.7	1.5	1.3	55.6
LC, $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	2.1	1.5	9.1	5.1	4.5	186

x – concentración del analito, $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$; SD – desviación estándar; LD – límite de detección (calculado en base a tres desviaciones estándar del ruido); LC – límite de cuantificación (calculado en base a diez desviaciones estándar del ruido)

A continuación, se intentó aplicar este procedimiento al análisis de una muestra de agua de desecho. Para separar los compuestos de interés de los posibles interferentes y obtener su preconcentración, se llevó a cabo la extracción en fase sólida utilizando un cartucho SepPak-Plus C18. Las condiciones experimentales se presentan esquemáticamente en la Figura 12.

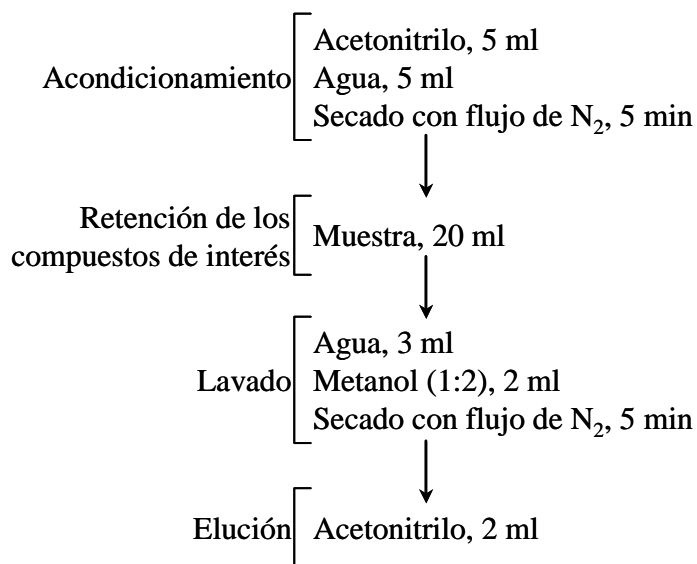


Figura 12. Condiciones de extracción en fase sólida en la separación/preconcentración de los benzotiazoles, MBO y PCF en agua residual.

Después de la elución, 20 μl de la solución fueron introducidos en el sistema cromatográfico (Tabla 10). Un cromatograma típico se presenta en la Figura 13, donde se observa la elución de varios compuestos que presentan considerables coeficientes de absorptividad molar en 280 nm, la mayoría de estos con cortos tiempos de retención, en la región de elución del MBO y MBT. La asignación de los picos cromatográficos basándose en la comparación de sus tiempos de retención con los obtenidos en el análisis de la mezcla de estándares no fue posible, ya que la matriz compleja de la muestra afectó ligeramente el proceso cromatográfico. Los resultados obtenidos por el método de adición de estándar permitieron identificar los picos del MBT ($t_{\text{ret}} = 3.40$ min), BT ($t_{\text{ret}} = 4.35$ min) y PCF ($t_{\text{ret}} = 8.31$ min). Por otro lado, en la muestra analizada no se detectó la presencia de TCMTB y de MTBT. Finalmente, es necesario destacar que no se detectó el pico cromatográfico del MBO, debido a su solapamiento con picos de compuestos desconocidos. Así que, bajo las condiciones empleadas, no se recomienda el uso del MBO como estándar interno. Para aumentar el factor de preconcentración, en las soluciones obtenidas en SPE se llevó a cabo la evaporación del acetonitrilo (en flujo de nitrógeno) y la redisolución del residuo en 200 μl de la fase móvil.

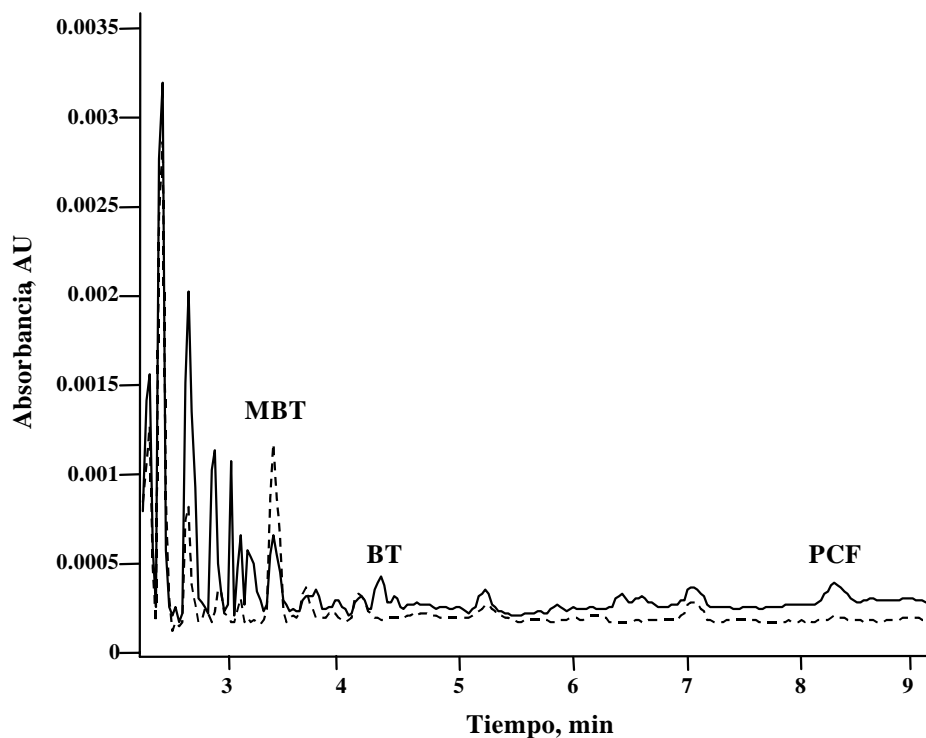


Figura 13. Cromatograma típico por HPLC del extracto (SPE) del agua de desecho: (—) detección en 280 nm y (-----) en 324 nm. (condiciones cromatográficas en la Tabla 10).

Después de esta etapa, la recuperación de los compuestos volátiles (BT, MTBT) fue inferior a un 10 %, pero se obtuvieron buenas recuperaciones para MBT, TCMTB y PCF ($87 \pm 5 \%$, $92 \pm 4 \%$ y $95 \pm 3 \%$, respectivamente). En conclusión, el procedimiento SPE-evaporación del disolvente–HPLC–UV/Vis resultó ser viable para la determinación del MBT, TCMBT y PCF en aguas de desecho. Sin embargo, ya que no se encontró un estándar interno adecuado, en la cuantificación es necesario utilizar el método de adición de estándar.

Con el fin de mejorar la selectividad del análisis y posiblemente, aumentar la magnitud de la respuesta del detector, se propuso realizar la derivatización pre-columna de los compuestos de interés. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

4.1.1 Derivatización pre-columna con 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl)

La Figura 14 presenta la estructura de la 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl), que es un compuesto estable de color amarillo (pf 97°C), soluble en solventes orgánicos y poco soluble en agua. Se ha reportado que el NBD-Cl reacciona fácilmente con aminas primarias y secundarias tanto en medios acuosos como orgánicos y también con fenoles y compuestos de tipo -tiol en medios alcalinos, formando derivados fluorescentes [53]. Considerando que el MBT y MBO, co-eluidos con los interferentes potenciales (Figura 13), tienen en su estructura el grupo –SH, se utilizó el NBD-Cl como un posible agente derivatizante; la Figura 15 presenta la reacción del MBT con NBD-Cl. Los efectos esperados de esta derivatización fueron: (1) el aumento de carácter apolar del MBO y MBT para obtener su elución con mayores tiempos de retención, fuera de la región de elución de interferentes y (2) el posible aumento de la sensibilidad.

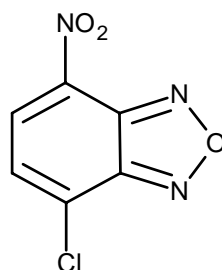


Figura 14. Estructura de la 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl).

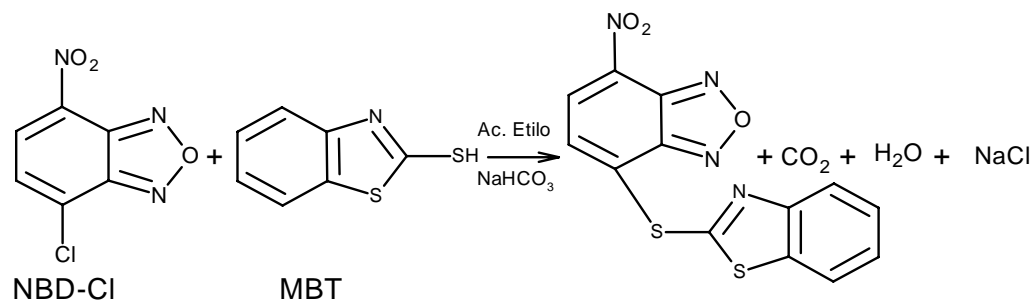


Figura 15. Reacción de derivatización del MBT con el NBD-Cl.

Para verificar la posibilidad de obtener los compuestos derivatizados y la selectividad de la reacción, se realizaron las pruebas de derivatización del estándar interno (MBO) y de cada uno de los analitos (MBT, TCMTB, MTBT, BT y PCF). Las condiciones de la reacción fueron seleccionadas experimentalmente, variando la temperatura (ambiente hasta 55 °C), tiempo (hasta 30 min), concentración del NBD-Cl (hasta 1.0 g·l⁻¹) y el tipo de disolvente utilizado para solubilizar el reactivo (metanol, acetato de etilo y acetonitrilo). En cada uno de los casos se obtuvieron los espectros de absorción (280 – 500 nm) de los productos, comparándolos con los espectros de los compuestos no-derivatizados. Cabe mencionar que los resultados fueron confirmados registrando los espectros de los compuestos después de su separación cromatográfica. Los resultados obtenidos indicaron que la reacción de derivatización fue selectiva para el MBO y MBT (espectros UV/Vis modificados), mientras que TCMTB, MTBT, BT y PCF no reaccionaron con el NBD-Cl (no hubo ningún cambio en los espectros UV/Vis). Cabe mencionar que los derivados de MBO y MBT no presentaron fluorescencia en la región de excitación de 280 – 400 nm, sin embargo, en sus espectros de absorción aparecieron nuevas bandas de absorción con el máximo en 390 nm. Tomando como criterio la mayor absorbancia en 390 nm, se definió el esquema final del procedimiento de derivatización, que se presenta en la Figura 16.

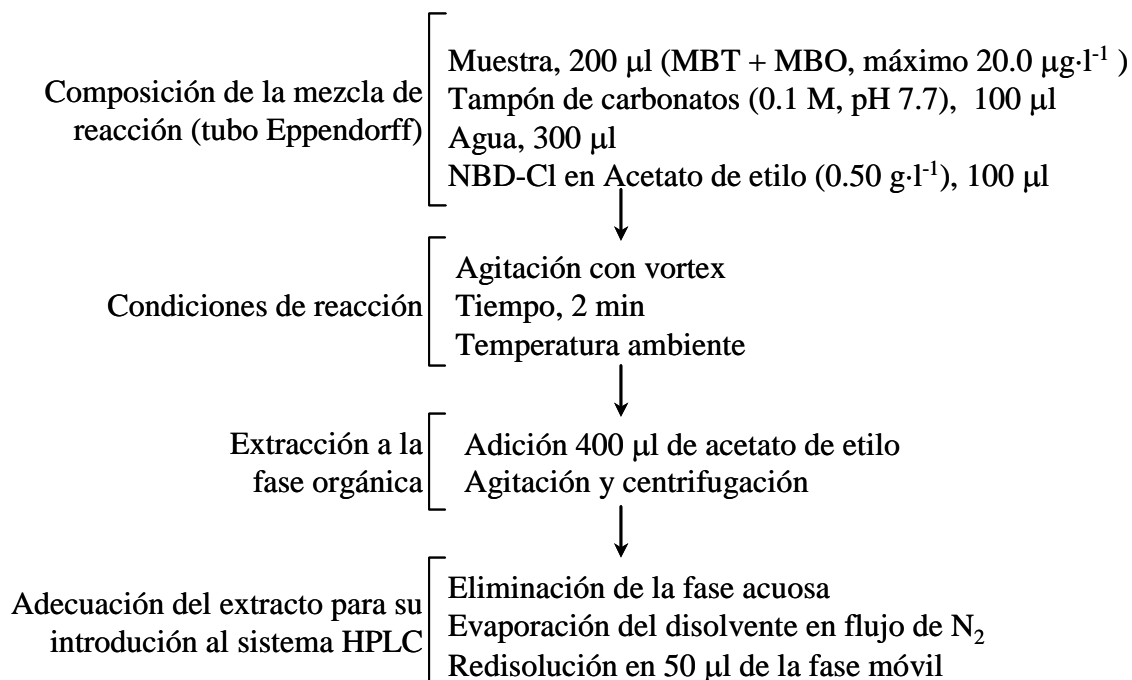


Figura 16. Esquema del procedimiento de derivatización del MBT y MBO con NBD-Cl.

Los espectros de absorción de la mezcla de reacción del MBT y MBO sin derivar y después de la derivatización con NBD-Cl se presentan en la Figura 17. En cuanto al mínimo local observado en los dos espectros en la Figura 17b, es necesario aclarar que la solución de referencia utilizada para el registro de espectros fue el blanco de la reacción (NBD-Cl, solución reguladora y solvente). Para llevar a cabo la derivación del MBT y MBO, estos compuestos fueron adicionados a la misma solución, por lo que la concentración del reactivo derivatizante fue inferior respecto a la solución de referencia. En relevancia a este estudio, es importante, que la derivatización del MBT y MBO permite cambiar la longitud de onda de la detección cromatográfica de 280 y 324 nm respectivamente a la longitud de onda 390 nm. De esta manera se obtiene mejor selectividad de la detección, ya que el número de compuestos orgánicos que presentan bandas de absorción en esta región de más altas longitudes de onda es limitado.

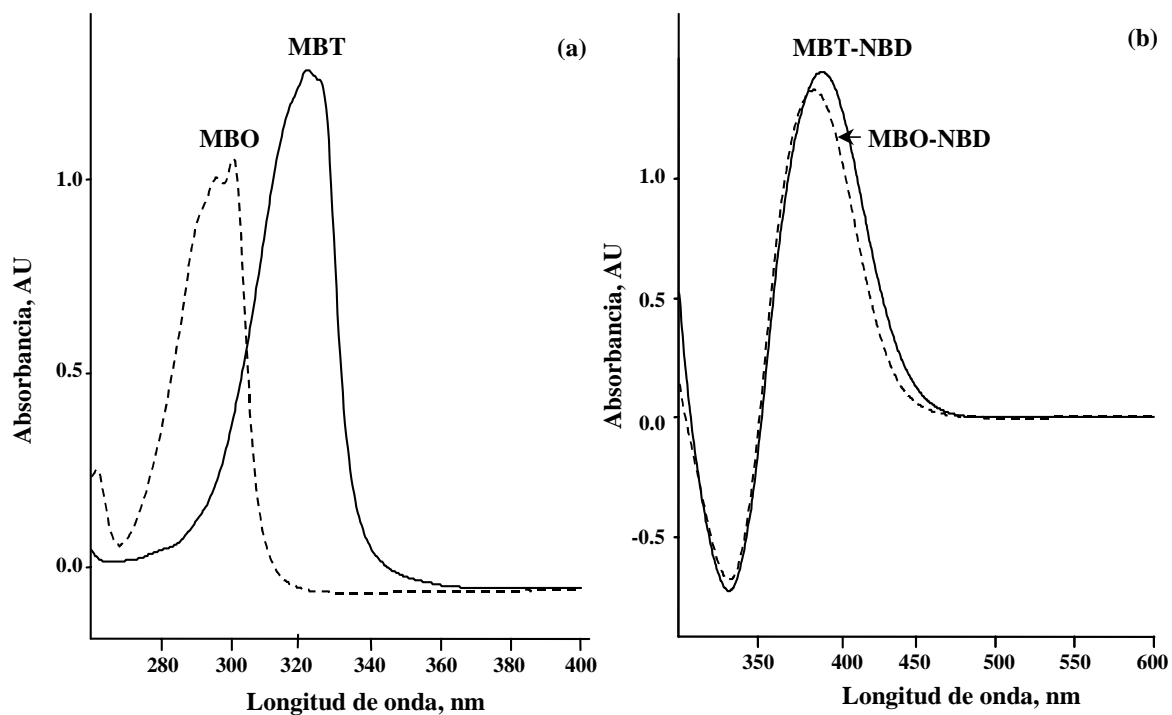


Figura 17. Espectros de absorción del MBO, $30.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (----) y MBT, $30.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (—) en acetato de etilo antes (a) y después de la derivatización con NBD-Cl (b).

Utilizando las condiciones establecidas (Figura 16), se llevó a cabo la derivatización de una solución acuosa conteniendo $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT y $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO. Después de la redisolución en la fase móvil, se introdujeron $20 \mu\text{l}$ de la solución al sistema cromatográfico utilizando las condiciones enlistadas en Tabla 10. El cromatograma obtenido con la detección en 390 nm (longitud de onda de referencia 560 nm , rendija 20 nm) se presenta en la Figura 18.

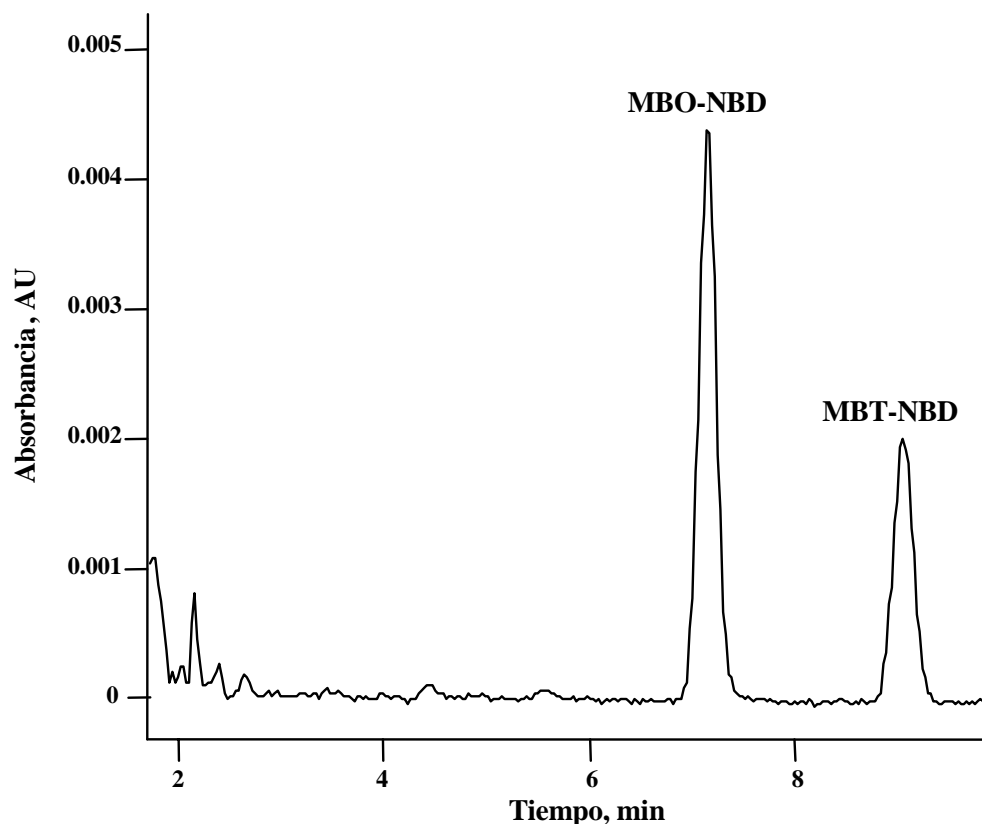


Figura 18. Cromatograma de la mezcla de estándares MBT ($8.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y MBO ($20.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) después de la derivatización pre-columna obtenido por HPLC en fase inversa con detección en 390 nm.

Al comparar el cromatograma obtenido sin derivatización del MBO y MBT (Figura 11) con el cromatograma de los productos de derivatización (Figura 18) se puede observar que el proceso de derivatización química ocasionó un aumento de los tiempos de retención del MBO (de 2.98 min a 7.15 min) y del MBT (de 3.32 min a 9.04 min, respectivamente). Esto indica claramente que los productos de derivatización (MBO-NBD y MBT-NBD) son menos polares respecto a MBO y MBT, eluyéndose de la columna en la región libre de posibles interferencias (Figura 13). A continuación se llevó a cabo el proceso de calibración de MBT utilizando concentraciones de 0.0, 0.40, 2.0, 4.0, 8.0 y $16.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en presencia del estándar interno ($20.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO) con derivatización (detección en 390 nm) y sin derivatización (MBO en 280 nm y MBT en 324 nm). En la Tabla 12 se presentan algunos parámetros analíticos obtenidos, incluyendo el coeficiente de determinación de la función de calibración (r^2), el valor de la relación señal/ruido (S/N), el límite de detección (LD, calculado en base a tres desviaciones estándar del ruido) y el límite de cuantificación (LC, calculado considerando diez desviaciones estándar del ruido).

Tabla 12. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración del MBT utilizando MBO como estándar interno, sin y con derivatización pre-columna con NBD-Cl.

Parámetro	Con derivatización	Sin derivatización
λ_{anal} , nm	390	324
t_{ret}	9.04	3.32
r^2	0.9998	0.9999
S/N	38.8	22.6
LD, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.2	0.4
LC, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.7	1.5

Es notorio que, en el análisis de los compuestos derivados se obtuvo un valor más alto del parámetro S/N, efecto que puede adscribirse al cambio de la longitud de onda de detección. Como ya se mencionó, la detección en la región de más altas longitudes de onda asegura mejor selectividad y provoca la disminución del ruido. En cuanto a los límites de detección y cuantificación estos no pueden compararse directamente debido a que se evaluaron en diferentes condiciones. En el caso del procedimiento sin derivatización, el límite de detección y el límite de cuantificación (Tabla 11) se evaluaron en base al cromatograma de una mezcla de estándares (Figura 11, página 35). Para el procedimiento con derivatización, en la evaluación del LD y LC se tomaron los datos de los cromatogramas de los estándares, obtenidos después de llevar a cabo el procedimiento que se muestra en la Figura 16. Resumiendo, el procedimiento de derivatización pre-columna con NBD-Cl ofrece dos importantes ventajas para el análisis del MBT en aguas residuales por el procedimiento propuesto en este trabajo. En primer lugar, los productos de la derivatización (MBO-NBD y MBT-NBD) son menos polares y se eluyen de la columna en la región libre de las interferencias observadas en el cromatograma sin derivatización (Figura 13). Por otra parte, la detección de los compuestos derivatizados puede llevarse a cabo en 390 nm con mejor selectividad respecto a las longitudes de onda utilizadas para MBT y MBO (324 y 280 nm). Por otro lado, el procedimiento basado en la derivatización química presenta ciertas limitaciones, ya que la reacción con NBD-Cl es selectiva solamente para MBT y MBO. A pesar de las mejores condiciones para determinar MBT en muestras reales, la fiabilidad de los resultados para otros analitos disminuye, debido a un tratamiento más complejo de la muestra. Por ello, el procedimiento se aplicó al análisis de muestras reales, enfocando el estudio en la aplicación del detector electroquímico.

4.2 Aplicación de la detección amperométrica en la determinación del MBT en muestras ambientales y clínicas por cromatografía de líquidos de alta resolución

En el desarrollo de esta parte del trabajo se tomaron como base las aplicaciones de la detección electroquímica reportadas en la literatura para el análisis de compuestos de azufre tales como cisteína, metionina, cistina [56-58] y glutatona [59]. En los estudios citados, la resolución de los compuestos fue obtenida por cromatografía de líquidos, mientras que el uso del detector electroquímico permitió aumentar la sensibilidad de la cuantificación. La presencia del grupo funcional -SH en las estructuras del MBT y MBO sugiere que estos dos compuestos pudieran exhibir electroactividad bajo las condiciones similares a las reportadas [56-59]. Por otro lado, los resultados presentados en la sección anterior indicaron serias limitaciones en el análisis del agua de desecho utilizando la detección espectrofotométrica. En primer lugar, el tratamiento del agua de desecho por SPE no fue selectivo y en consecuencia, en los cromatogramas obtenidos se observó la elución de varios compuestos que provocaron interferencias en la región de elución del MBT y MBO (Figura 13). Además, no se logró la cuantificación del MBT. Con la aplicación de la detección amperométrica se espera superar los problemas detectados. Se propuso también aplicar la misma estrategia analítica para la determinación del MBT en muestras de orina humana, lo cual podría servir en la evaluación de la exposición laboral de los trabajadores de las curtidurías al fungicida TCMTB.

En la primera etapa se llevó a cabo el análisis del MBT y MBO por voltamperometría cíclica. Se utilizó el siguiente sistema electroquímico: electrodo circular de carbón vítreo (28 mm^2 de área superficial), electrodo auxiliar de platino, electrodo de referencia Ag/AgCl y ácido fosfórico ($3.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) : acetonitrilo (60:40) como electrolito soporte. Esta composición fue seleccionada para simular la posible composición de la fase móvil. Después de desgasificar las soluciones (flujo de nitrógeno), se registraron los voltamperogramas cíclicos del MBT ($0.10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y MBO ($0.10 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en un intervalo de potenciales de +1500 mV a -1500 mV y a una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. En la Figura 19 se observa la reducción del MBT a -700 mV y del MBO a -500 mV. Los dos procesos de oxidación, que se pueden detectar en los voltamperogramas ocurren a los mismos potenciales para los dos compuestos (450 mV y 900 mV). De estos resultados se

deduce que la detección amperométrica de los dos compuestos pudiera ser viable a potenciales mayores de 450 mV.

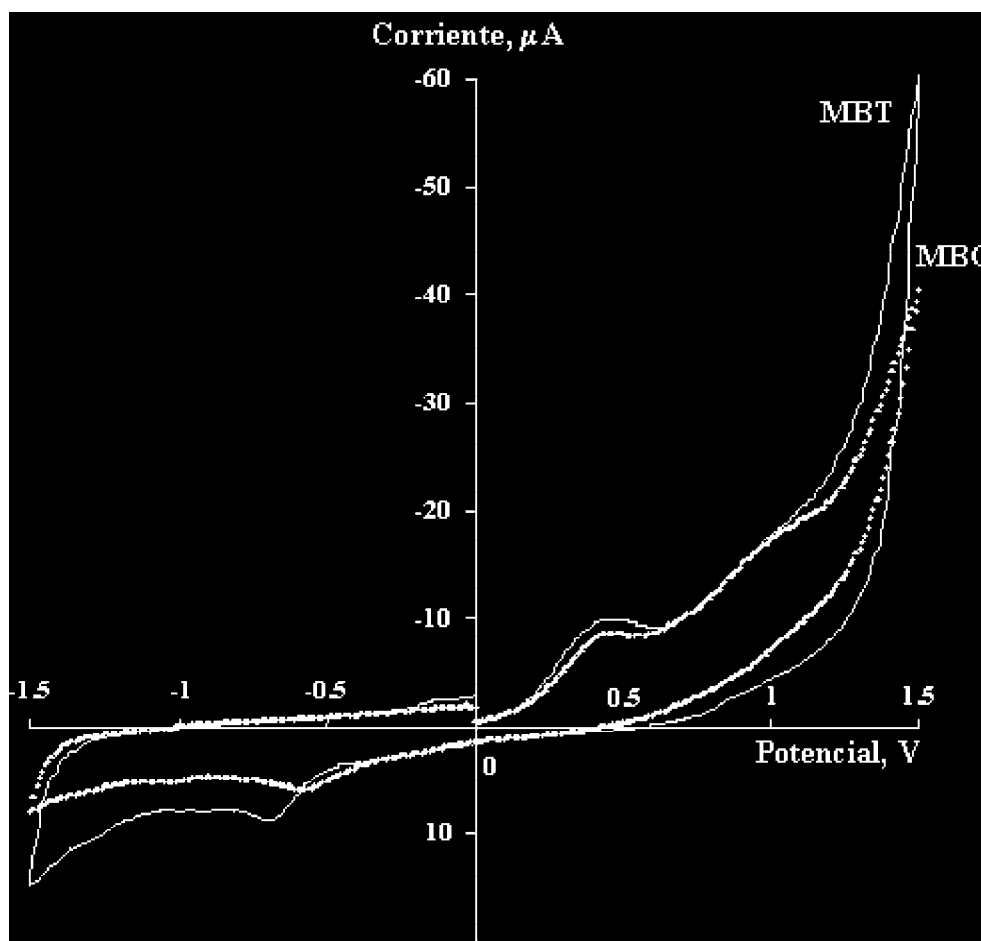


Figura 19. Voltamperogramas cíclicos del MBT (—) y MBO (----). ($c_{MBO} = c_{MBT} = 0.10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, electrolito soporte H_3PO_4 ($3.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) : acetonitrilo (60:40), velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

En cuanto a las condiciones de separación cromatográfica, cabe resaltar que fue necesaria una modificación con respecto a las condiciones utilizadas en la sección anterior (Tabla 10). En este caso, el interés principal fue la resolución del MBT y MBO (aplicando un potencial, el detector electroquímico permite la detección solamente de los compuestos que, bajo estas condiciones, presentan electroactividad). Por otro lado, los componentes de la fase móvil no deberían afectar la respuesta del detector. Con el fin de minimizar la señal de ruido del detector (valor de offset) se probaron tres diferentes fases móviles, mezclas de una solución reguladora (pH 2.0 – 4.5) con el modificador orgánico (acetonitrilo) en diferentes proporciones. Las soluciones reguladoras (tampón de acetatos, tampón de

fosfatos, ácido monocloroacético y ácido fosfórico) estuvieron en el rango de concentración de $0.10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hasta $20.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. En cada uno de los casos se adicionó una solución de EDTA ($0.10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) para enmascarar los iones metálicos que pudieran formar complejos o sales con MBT [1]. En estos experimentos se utilizó el electrodo de oro al potencial de 900 mV. Siguiendo el criterio de más alto valor S/N, para el trabajo futuro se seleccionó la fase móvil de ácido fosfórico ($3.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 2.4):acetonitrilo (1:1) y la elución isocrática. Bajo estas condiciones, el MBO y MBT fueron resueltos con los tiempos de retención 5.9 min y 7.2 min respectivamente.

Una vez establecidas las condiciones de separación, se seleccionaron las condiciones de detección, tomando en cuenta el tipo de electrodo de trabajo y el potencial aplicado. En primer lugar, se utilizaron electrodos de oro y de carbón vítreo (superficie de 28 mm^2) y, en cada uno de los casos se registraron una serie de cromatogramas de la mezcla de estándares ($0.10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ MBT y $0.10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ MBO) variando el potencial en el rango de 400 mV hasta 1250 mV. Relativamente, el valor más alto de la relación señal/ruido (S/N) fue obtenido a un potencial 900 mV. En la Figura 20 se presentan los cromatogramas de los estándares registrados a este potencial con dos diferentes electrodos de trabajo (área de superficie 28 mm^2). Se observa claramente que, con el electrodo de oro se obtuvo una magnitud mayor de los picos cromatográficos de los dos compuestos. Estos resultados confirman los reportes anteriores sobre la oxidación selectiva de los tioles sobre electrodos de este metal noble en muestras clínicas [63-66]. Cabe aclarar que, el primer pico en cromatograma ($t_{\text{ret}} = 2.2 \text{ min}$) corresponde a la región de volumen muerto de la columna y pudiera atribuirse a algún contaminante presente en los estándares.

Ya se mencionó que, en el detector utilizado en este estudio se aplica un potencial constante, con el riesgo de pasivar el electrodo. Dicha pasivación puede ser provocada por la adsorción de compuestos organosulfurados o sus productos de oxidación [60]. Para estudiar este efecto, se utilizaron los mismos dos electrodos (oro y carbón vítreo, 28 mm^2). En cada caso, se registró una serie de las señales del MBT y MBO inyectando las soluciones estándar al sistema, pero sin presencia de la columna cromatográfica (las condiciones de análisis por inyección en flujo). La columna fue eliminada para acortar el tiempo del experimento y también debido a las elevadas concentraciones de los dos compuestos ($5.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). En la Figura 21 se observa una disminución gradual de las señales consecutivas

obtenidas en el experimento con el electrodo de oro, lo que indica la pasivación del electrodo. De acuerdo con los reportes bibliográficos, no se observó el efecto de pasivación sobre el electrodo de carbón vítreo [61, 82].

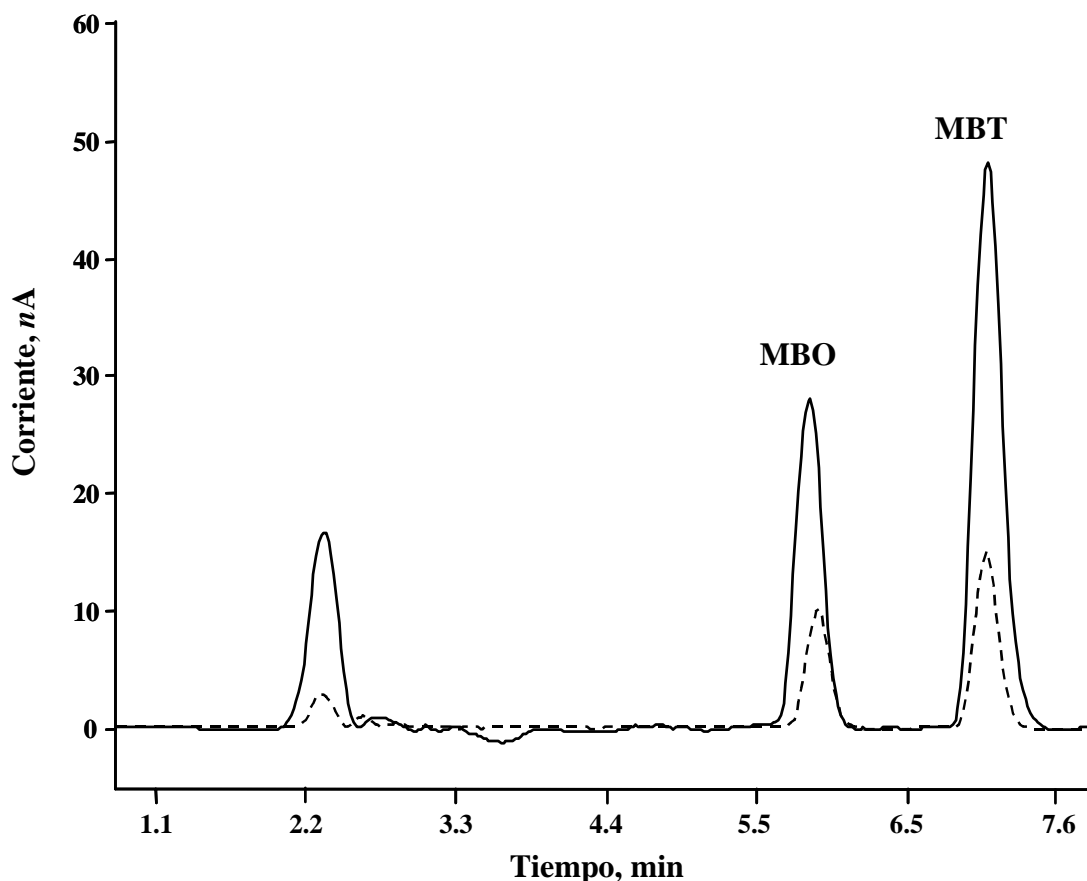


Figura 20. Cromatogramas típicos de la mezcla de MBT y MBO ($0.50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) obtenidos con un electrodo de oro (—) y otro de carbón vítreo (---). (Las condiciones experimentales se describen en la Tabla 14).

Diferentes autores han reportado que los compuestos adsorbidos en el electrodo pueden ser reducidos catódicamente para reestablecer la actividad original del electrodo antes del siguiente ciclo de detección [83, 84]. Para regenerar la superficie del electrodo de oro, después del registro de cada cromatograma se aplicó un potencial fuertemente reductor (-1200 mV) con duración de 0.1 y 2.0 min. Los resultados obtenidos para el MBT se muestran en la Figura 22, donde la primera inyección fue realizada después de la pasivación del electrodo. Se observa que con un corto tiempo de regeneración, después de cinco ciclos se obtuvo la recuperación de la señal analítica al 70 % (respecto a la señal registrada con el

electrodo limpio). Por otro lado, un tiempo más largo de regeneración aseguró la recuperación de la señal al 100 % en el primer ciclo y su buena estabilidad en ciclos consecutivos (coeficiente de variación para 10 inyecciones 1.5 %). Estos resultados indican que, en presencia de elevadas concentraciones de MBT y MBO, es necesaria la regeneración de la superficie del electrodo de oro, seleccionando el potencial de -1200 mV, aplicado durante 2.0 min.

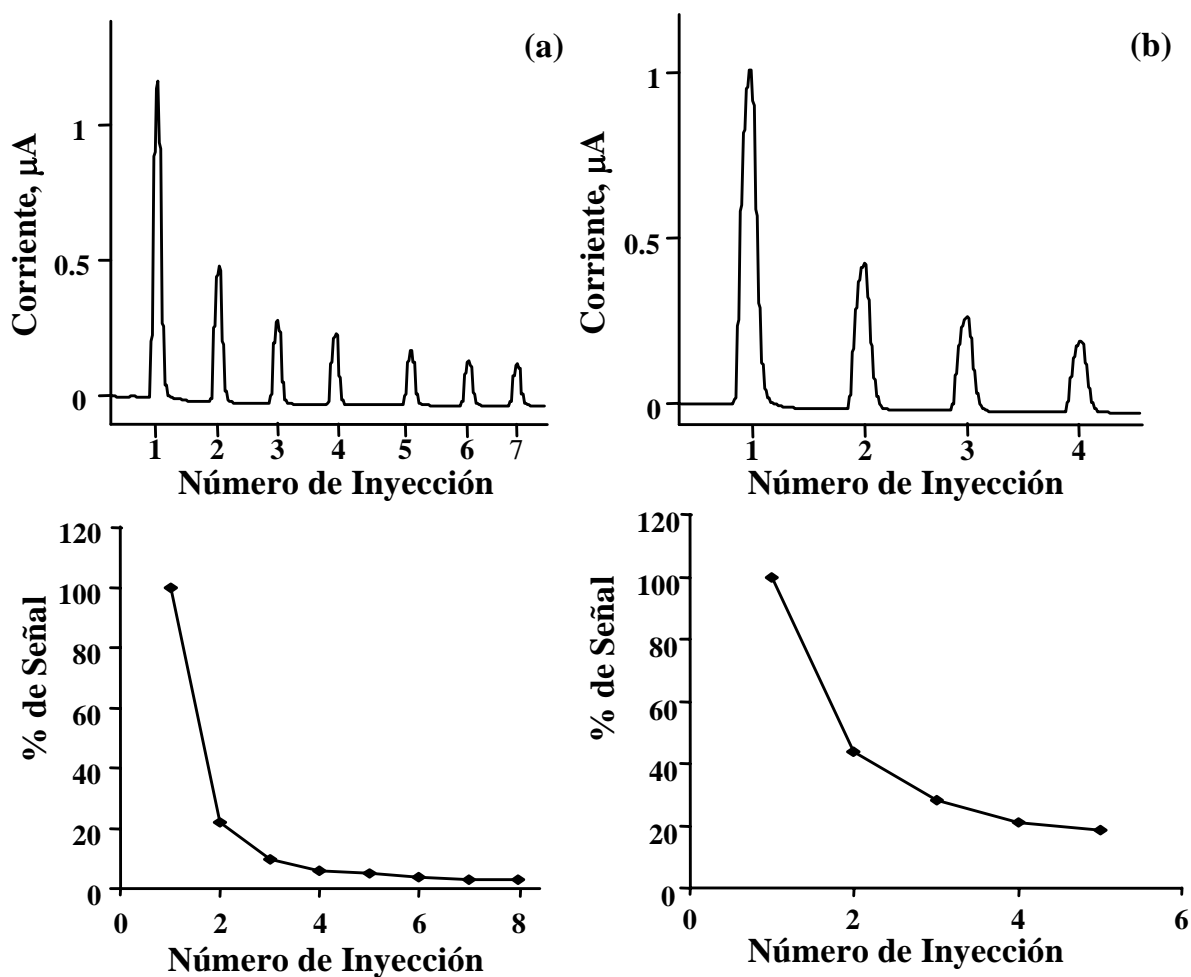


Figura 21. Disminución de la señal amperométrica de (a) MBT y (b) MBO en inyecciones consecutivas. ($C_{\text{MBT}} = C_{\text{MBO}} = 5.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, electrodo de Au, 900 mV, sin columna cromatográfica).

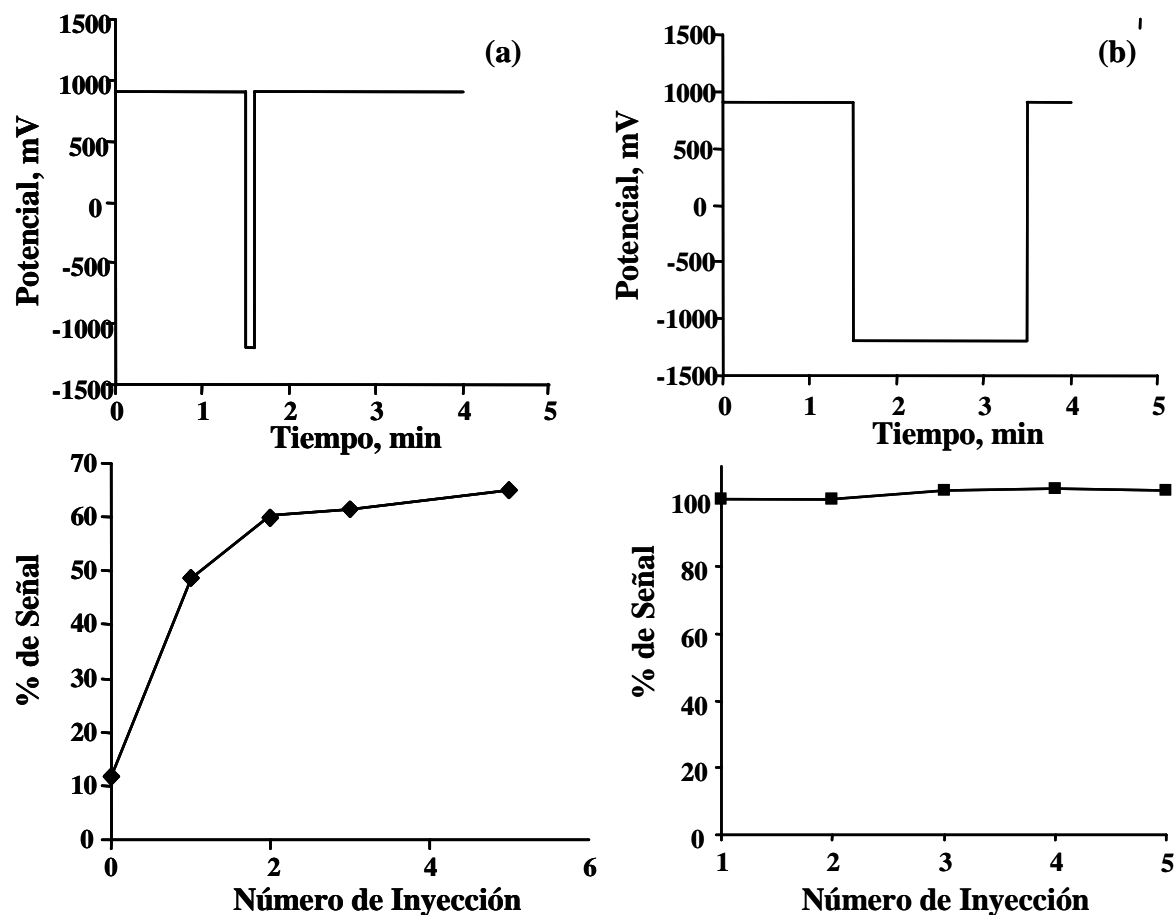


Figura 22. Efecto de la aplicación del potencial negativo durante (a) 0.1 min y (b) 2 min después de cada ciclo cromatográfico en la señal amperométrica del MBT. ($C_{\text{MBT}} = 5.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, electrodo de oro, área de superficie 28 mm^2 , 900 mV)

En resumen, los datos obtenidos hasta ahora indican que el uso de electrodo de oro asegura una mejor sensibilidad de la detección, pero se presentan problemas relacionados con la pasivación de la superficie del electrodo de oro por la adsorción de los compuestos de azufre. Estos problemas se pueden resolver introduciendo la etapa de regeneración de la superficie, sin embargo aumentaría el tiempo de análisis. Por otra parte, es lógico que la sensibilidad de la detección depende no solamente del material de electrodo, sino también de su área de superficie. Para examinar este efecto, se utilizó un electrodo de carbón vítreo más grande (área de superficie 113 mm^2) y se obtuvieron los cromatogramas de la mezcla de los estándares ($0.10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ MBT y $0.10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ MBO) variando el potencial en el rango de 400 mV hasta 1250 mV. En la Tabla 13 se comparan los valores de S/N, del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) para el MBT y MBO, que fueron evaluados en los experimentos con electrodos de oro y de carbón vítreo.

Tabla 13. Comparación de los parámetros analíticos evaluados en el análisis del MBT y MBO por cromatografía líquida con detección amperométrica. (0.1 mg·l⁻¹ MBT y MBO, señal analítica medida como la altura de pico cromatográfico).

Condiciones de detección			Parámetros analíticos evaluados					
Electrodo	Superficie	Potencial	MBT			MBO		
			S/N	LD	LC	S/N	LD	LC
Oro	28 mm ²	900 mV	10.5	5.0	6.0	6.1	8.0	27.0
	28 mm ²	900 mV	6.6	8.0	25.0	4.4	11.0	38.0
Carbón vítreo	113 mm ²	600 mV	7.0	7.0	22.0	0.4	178	593
		1250 mV	39.5	1.0	4.0	27.0	2.0	6.0

LD, LC – límites de detección y de cuantificación, µg·l⁻¹

En esta tabla se confirma que, al comparar los electrodos de oro y carbón vítreo (28 mm²), la sensibilidad de la detección pudiera ser mejor al utilizar el electrodo de oro. Sin embargo, debido a los problemas de pasivación, se optó por el electrodo de carbón vítreo. Para asegurar una respuesta sensible, se aumentó la superficie del electrodo (113 mm²). En cuanto al valor del potencial, la tendencia general fue un aumento de la señal a los potenciales más altos. Sin embargo, al aplicar altos potenciales, se observó mayor ruido. Por lo tanto, el criterio de selección fue la relación S/N.

Para mayor claridad, en la Tabla 14 se resumen las condiciones experimentales seleccionadas en los experimentos que se acaban de presentar.

Tabla 14. Condiciones experimentales para el análisis del MBT y MBO por cromatografía líquida de alta resolución con detección amperométrica.

Separación cromatográfica	
Columna	Hypersil C18, 5 µm, 250 × 4.6mm
Fase móvil	Ácido fosfórico (3.0 mmol·l ⁻¹ , pH 2.4): Acetonitrilo (1:1)
Elución	Isocrática
Flujo	1 ml·min ⁻¹
Volumen de inyección	20 µl
Detección amperométrica	
Electrodo de trabajo	Carbón vítreo (113 mm ²)
Electrodo de referencia	Ag/AgCl
Potencial	1250 mV

A continuación se llevó a cabo el proceso de calibración. Se registraron los cromatogramas de las soluciones estándar conteniendo 0.0, 3.0, 6.0, 9.0 y 15.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT y 30.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO (estándar interno). Tomando la relación entre las alturas de los picos cromatográficos de MBT y MBO como la señal analítica, se obtuvieron la ecuación de la función de calibración, el límite de detección y el límite de cuantificación (LC) presentados en la Tabla 15. La curva de calibración se presenta en la Figura 23.

Tabla 15. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración del MBT utilizando el método de estándar interno (MBO). (Condiciones experimentales en Tabla 14).

Función de calibración	$-0.0022x^2 + 0.13x + 0.0021$
r^2	0.9995
LD, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	1.0
LC, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	4.0

x – concentración del analito, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

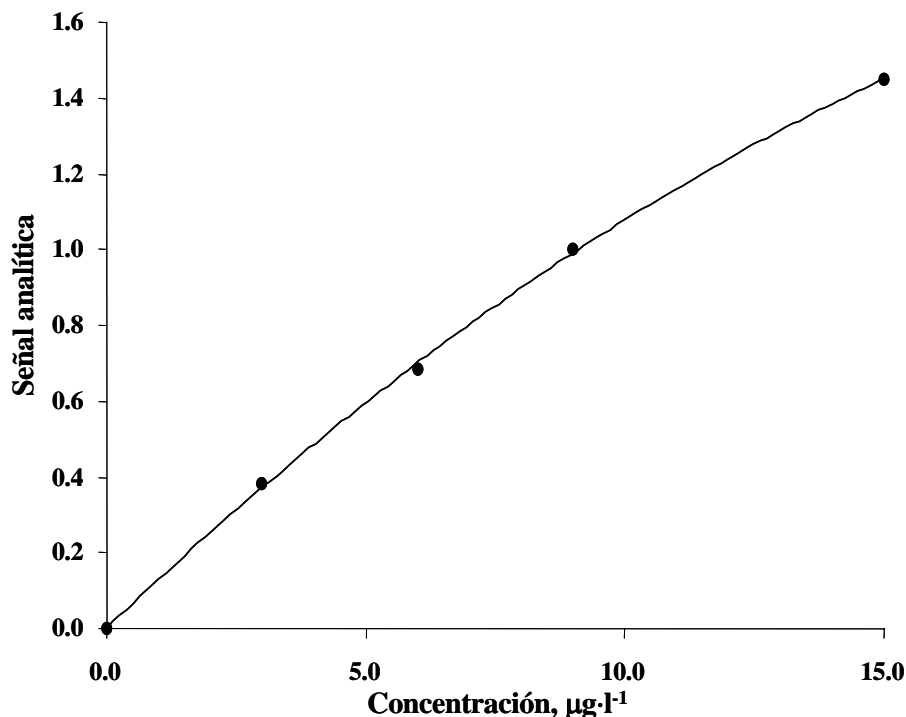


Figura 23. Curva de calibración para el MBT (0.0, 3.0, 6.0, 9.0 y 15.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) utilizando MBO como estándar interno (30.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Debido al uso de diferentes sistemas cromatográficos, la comparación directa de los parámetros analíticos obtenidos en el análisis de MBT con dos tipos de detectores no es viable. Con el fin de comparar la sensibilidad de la respuesta para MBT y MBO con el uso del detector amperométrico frente al espectrofotométrico (longitud de onda 324 nm), se conectaron los dos detectores en línea. Utilizando las condiciones de separación establecidas para la detección electroquímica (Tabla 14), se obtuvieron los cromatogramas de las soluciones estándar de MBT (0.0, 30.0, 60.0, 90.0, 120.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). En base a las señales registradas con los dos detectores se evaluaron las funciones de calibración por el método de regresión lineal. La sensibilidad está definida como la mínima diferencia en la concentración del analito que puede ser distinguida estadísticamente por la respuesta del instrumento. La medida práctica de la sensibilidad es el valor de la pendiente de la función de calibración obtenida por regresión lineal (s). En este caso, al utilizar las señales amperométricas se obtuvo una mayor pendiente de la función de calibración, siendo la relación entre las pendientes evaluadas para los dos tipos de respuesta aproximadamente de 23. En este experimento se confirmó que el detector electroquímico es el más adecuado para la cuantificación de MBT a nivel de trazas o ultratrazas, en soluciones sintéticas.

El procedimiento cromatográfico con la detección amperométrica fue aplicado para la determinación del MBT en aguas de desecho municipal. Para ello 3.5 ml de agua de desecho (filtrada) fueron acidificados con 50 μl del ácido fosfórico 8 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Se llevó a cabo la extracción de MBT y MBO con 500 μl de cloruro de metileno (Vortex) [1]. Después de la centrifugación, la fase acuosa fue eliminada y el cloruro de metileno evaporado con flujo de nitrógeno. El residuo fue redissuelto en 100 μl de la fase móvil e introducido al sistema cromatográfico (Tabla 14). El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 24. El pico con tiempo de retención 9.7 min pudiera asignarse a la elución de MBT, aunque su tiempo de retención es más largo que el observado en las soluciones estándar (7.2 min, Figura 20).

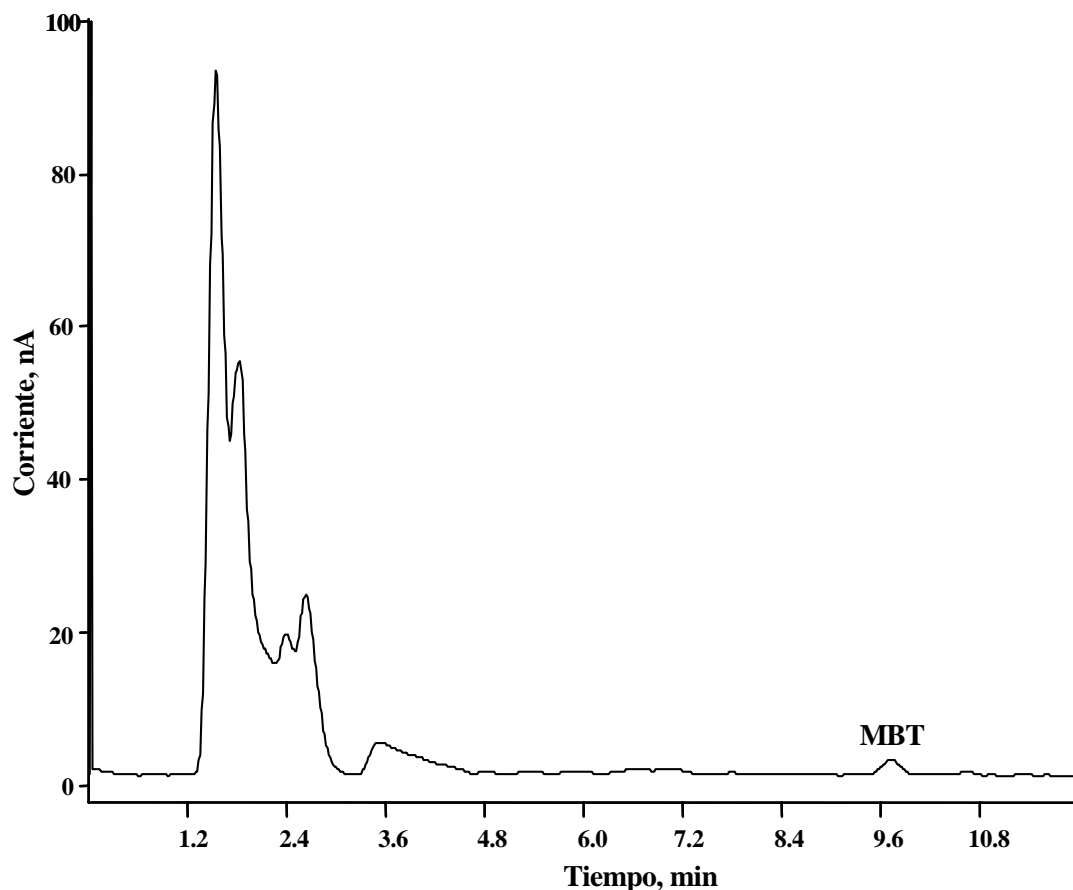


Figura 24. Cromatograma de una muestra de agua de desecho municipal. (El tratamiento de la muestra se describe en el texto. Condiciones de separación y detección en la Tabla 14).

La confirmación de la identidad del compuesto eluido en 9.7 min se obtuvo por el método de adición de estándar. Para ello, la muestra (3.5 ml) fue enriquecida con 500 μl de la solución estándar de MBT y MBO ($400.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ cada uno). Se obtuvieron los cromatogramas que se presentan en la Figura 25. El primero fue obtenido directamente después de fortificación de la muestra y el otro después del procedimiento de extracción y preconcentración (de manera igual como la muestra, cuyo cromatograma se presenta en la Figura 24). El aumento de la señal del pico eluido en 9.7 min después de adición del estándar permite asignar este pico al MBT. El MBO fue eluido en un tiempo más corto ($t_{\text{ret}} = 7.2 \text{ min}$), de acuerdo con el cromatograma de los estándares puros (Figura 20). Por otro lado, se observa que la extracción con cloruro de metileno es relativamente selectiva para los compuestos de interés (cromatograma “limpio” en la región de 2 a 4 minutos, Figura 25). También es claro que con el procedimiento aplicado se obtuvo una preconcentración del MBT y MBO.

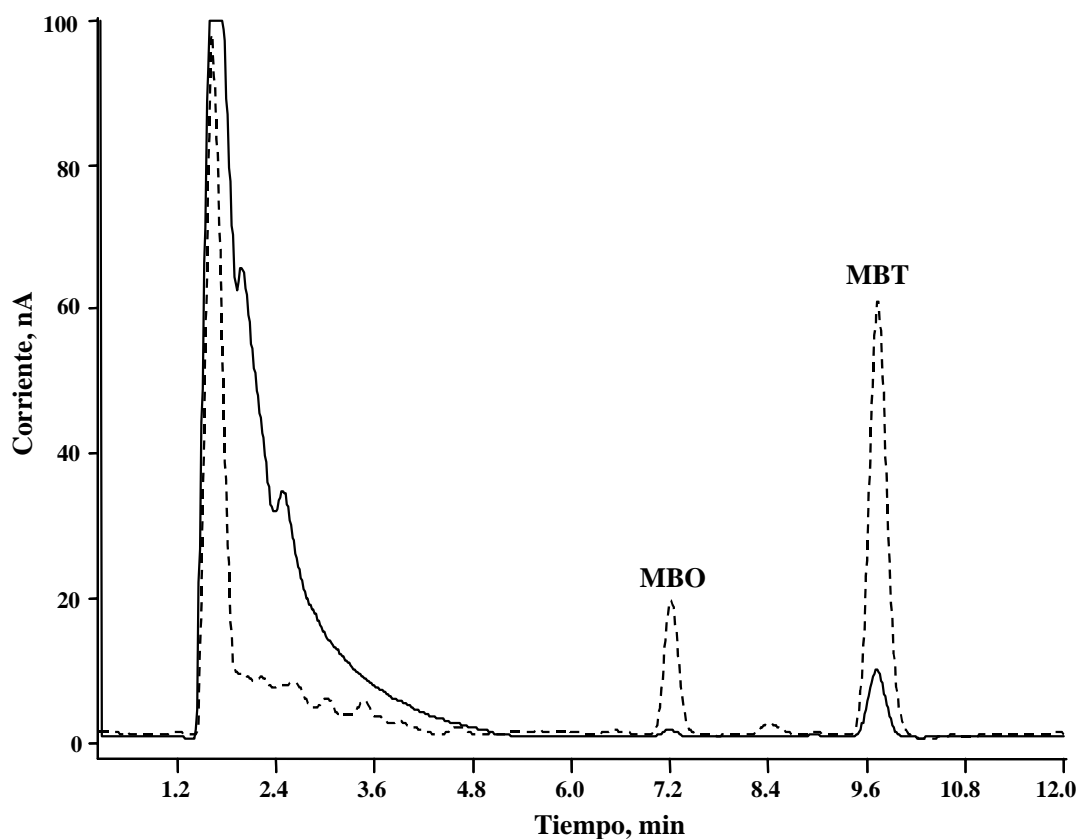


Figura 25. Cromatograma de una muestra de agua de desecho municipal fortificada con MBO y MBT (Concentración en la muestra $57.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). (—) muestra sin tratamiento, (----) después de extracción y preconcentración por evaporación del disolvente.

La concentración del MBT en el agua de desecho evaluada por el método de adición de estándar y por la calibración externa fue $1.9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente. La discrepancia entre estos valores sugiere que las señales obtenidas en la muestra real fueron afectadas por las interferencias de matriz. Esto indica que la cuantificación tiene que llevarse a cabo por el método de adición estándar.

La segunda aplicación de la cromatografía líquida con la detección electroquímica fue el análisis de MBT en orina. De acuerdo con la bibliografía [37], en este caso es necesario llevar a cabo una hidrólisis ácida para liberar el MBT presente en la orina en forma de glucuronato. En el tubo de Eppendorf, a $650 \mu\text{l}$ de orina se adicionaron $250 \mu\text{l}$ de ácido fosfórico $8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, el tubo fue cerrado e incubado en baño María (95°C , 1 hr). Después de centrifugar, se transfirió la solución a un nuevo tubo y se llevó a cabo la extracción con $500 \mu\text{l}$ de cloruro de metileno. Para aumentar la selectividad de la

separación, los posibles interferentes de carácter ácido (extraídos junto con el MBT y MBO) fueron eliminados por lavado con 500 μl de hidróxido de sodio $0.10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Finalmente, se realizó el lavado de la fase orgánica con 500 μl de agua desionizada y, después de la eliminación de la fase acuosa el disolvente fue evaporado en flujo de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 100 μl de la fase móvil y se introdujo en la columna. Siguiendo el mismo protocolo se prepararon las muestras de orina fortificadas con MBO y MBT. A una muestra de orina se adicionaron 100 μl de la solución conteniendo $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO y MBT y a la otra 100 μl de la solución conteniendo $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de estos compuestos. Utilizando el mismo sistema cromatográfico y las mismas condiciones de separación/detección que en el análisis de agua residual, se observó la co-elución de varios compuestos en la región del pico de MBT. Para mejorar la resolución, se cambió la columna a una de carácter más lipofílico. En lugar de la columna Hypersil C18, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6\text{mm}$ (Tabla 14) se utilizó la columna Kromasil C18, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6\text{mm}$. En primer lugar, en el análisis de la muestra de orina no se detectó la presencia de MBT. Los cromatogramas de las muestras fortificadas con MBT y MBO se presentan en la Figura 26. En este caso, si se observa la elución de los dos compuestos pero la magnitud de las señales es muy baja respecto a los resultados obtenidos en la separación de los estándares (Figura 20). Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del procedimiento por cromatografía líquida con detección electroquímica para la determinación de MBT en orina con MBO como estándar interno. Sin embargo, se requieren más estudios para definir un protocolo de tratamiento de muestra que permita reducir las pérdidas de los dos compuestos durante la etapa de pretratamiento de la muestra.

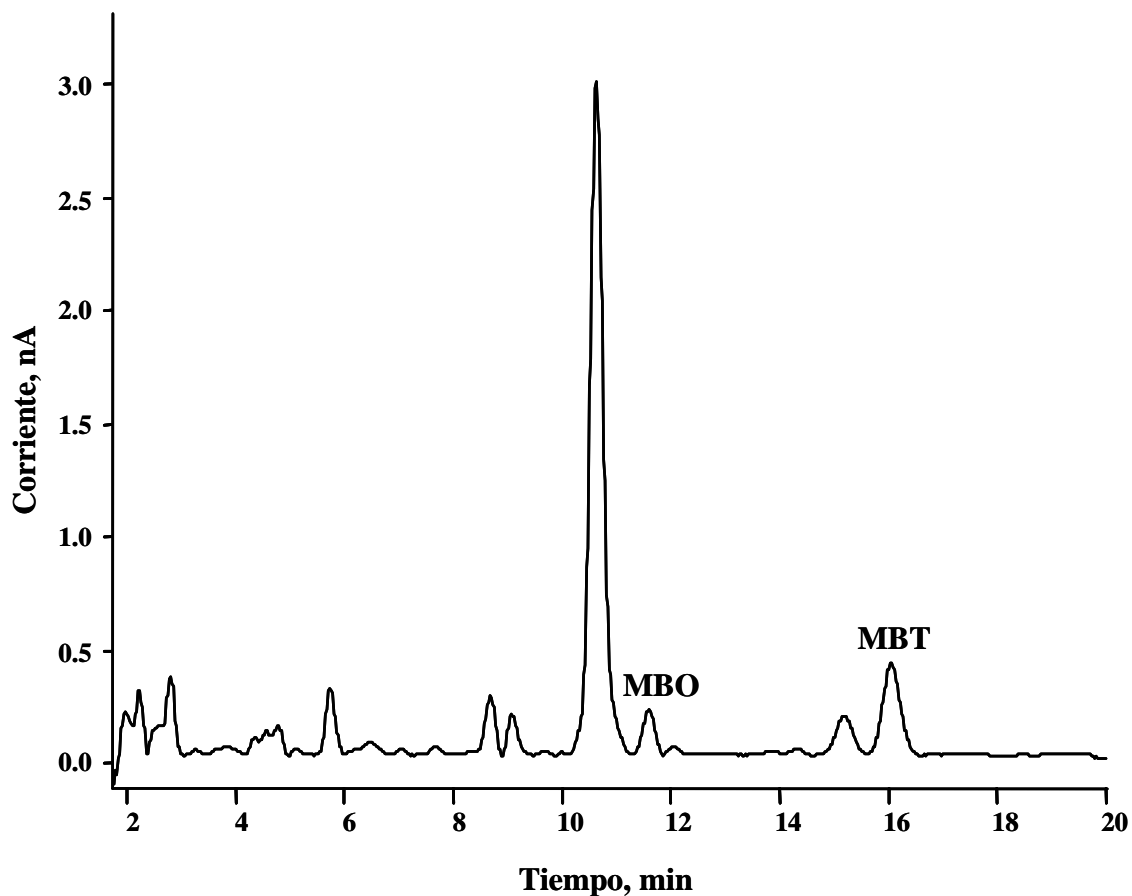


Figura 26. Cromatograma de la muestra de orina fortificada con (—) $0.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO y de MBT. Columna cromatográfica: Kromasil C18, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6\text{mm}$, fase móvil: ácido fosfórico ($3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 2.4): Acetonitrilo (73:27), las demás condiciones cromatográficas y de detección como en la Tabla 14).

4.3 Estudio sobre la posible aplicación de la voltamperometría adsortiva de redisolución catódica con onda catalítica de protones en la determinación del MBT en aguas de desecho

Los estudios que se presentan en esta sección son continuación de los experimentos realizados en este laboratorio [1] sobre la determinación electroquímica del MBT por voltamperometría adsortiva de redisolución catódica y considerando la formación de la señal del MBT correspondiente a una onda catalítica de protones (ver sección 1.7.3). En el desarrollo experimental se adoptaron las condiciones instrumentales propuestas por Hinojosa en su trabajo (Tabla 16). El objetivo fue refinar las condiciones utilizadas anteriormente para obtener un procedimiento más versátil, con el fin de su posible aplicación en el análisis de muestras medio ambientales.

Tabla 16. Condiciones de trabajo utilizadas en la determinación del MBT por voltamperometría adsortiva de redisolución catódica, basada en la formación de la onda catalítica de protones.

Parámetro	
Técnica analítica	Voltamperometría de onda cuadrada
Potencial de acumulación	0 mV
Tamaño de gota	6*
Tiempo de acumulación	20 s
Frecuencia	200 Hz
Amplitud de pulso	20 mV
Tiempo de pulso	15 ms
Tiempo de medida	1 ms
Velocidad de barrido	60 mV·s ⁻¹

*Área aproximada, 0.4 mm²

Para obtener la señal catalítica del MBT, se utilizó el ácido sulfúrico y el ácido fosfórico, observándose la mayor magnitud de la señal en presencia de este último. Para incrementar la intensidad de la señal catalítica se estudió el efecto de un ácido más fuerte. Se seleccionó el ácido trifluoroacético (TFA), ya que en su presencia no se observó un aumento del ruido en la medición electroanalítica. Otra contribución original fue emplear la extracción en fase sólida (SPE) en la determinación del MBT en aguas residuales. Con este tratamiento se buscaba realizar la preconcentración del MBT y eliminar los compuestos que pudieran interferir en la etapa de análisis voltamperométrico.

En primer lugar, se comparó el efecto del ácido trifluoroacético y del ácido fosfórico en la magnitud de la señal de onda catalítica de protones en presencia del MBT. En la Figura 27 se presentan los voltamperogramas obtenidos para $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT y una concentración $25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de cada uno de los ácidos mencionados (volumen introducido en la celda electroquímica, 20 ml). Cabe señalar que la señal de onda catalítica apareció, en cada uno de los casos, a un potencial de 1150 mV (vs. Ag/AgCl). Se puede observar que, en presencia de TFA, se obtuvo una mayor señal analítica.

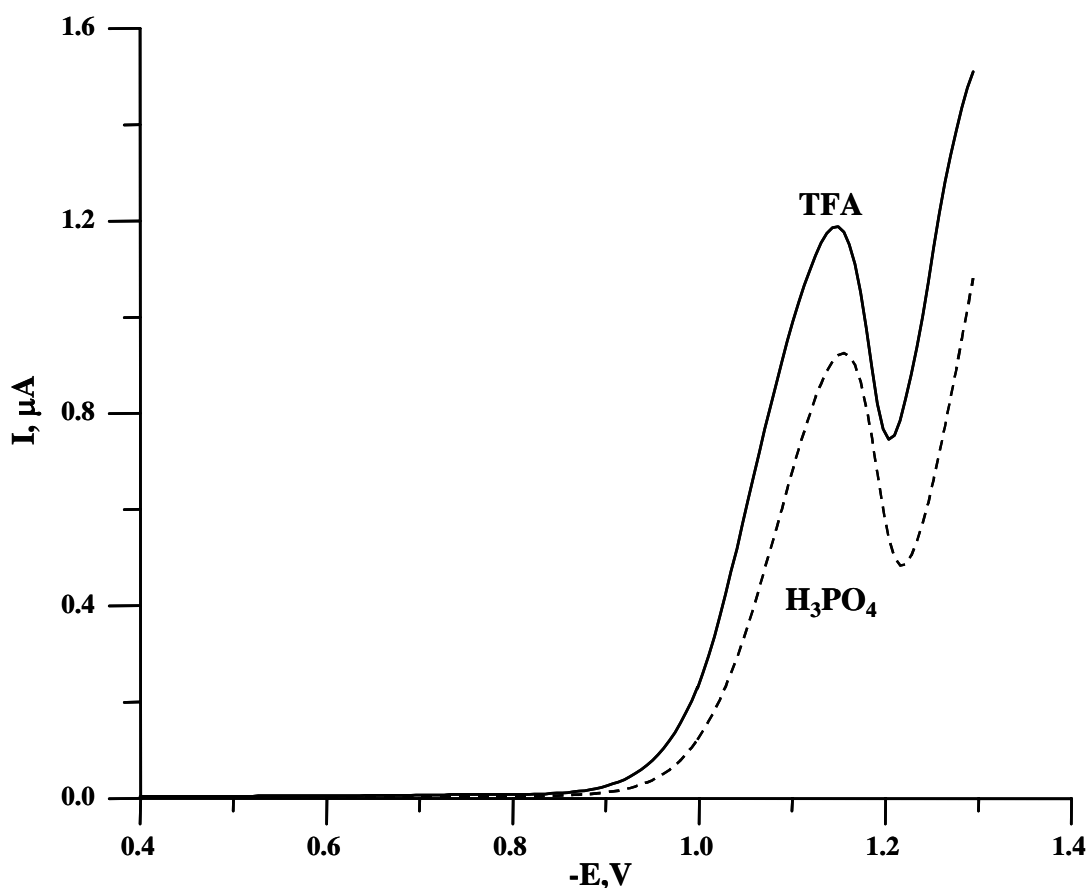


Figura 27. Voltamperograma de $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ MBT en presencia de (---) $25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 y (—) $25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de TFA (condiciones instrumentales en la Tabla 16).

A continuación se realizaron los experimentos para determinar el efecto de la concentración de cada uno de los ácidos sobre la intensidad de la señal voltamperométrica, los resultados se presentan en la Figura 28.

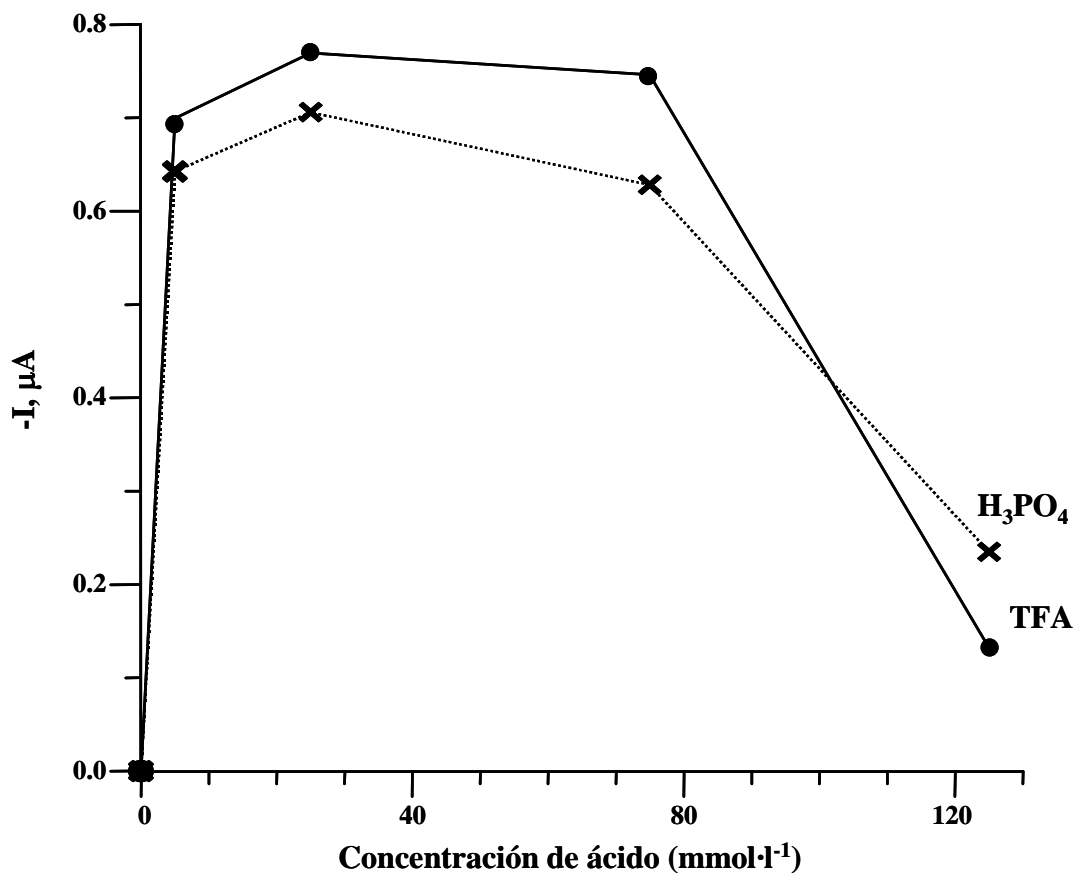


Figura 28. Efecto de la concentración del (—) ácido trifluoroacético y del (----) ácido fosfórico en la señal catalítica de protones generada por una concentración de $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT.

En primer lugar se observa que la presencia del ácido es necesaria para obtener la señal de la onda catalítica de protones. El incremento gradual en la concentración del ácido hasta el valor de aproximadamente $20.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ provoca que la señal voltamperométrica aumente, mientras que para las concentraciones mayores de $80.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de nuevo se observa una disminución en la señal analítica. De ahí, que el intervalo de concentraciones del ácido de 25.0 a $90.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ es el más adecuado para los fines analíticos. Tomando en cuenta la mayor señal analítica en presencia de TFA (Figura 27) y el efecto de su concentración, se seleccionó este ácido ($25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) para el trabajo futuro.

Los resultados presentados hasta ahora se obtuvieron utilizando las soluciones estándar de MBT, en ausencia de cualquier posible interferente de matriz. Sin embargo, de acuerdo con los datos bibliográficos [78] y los efectos observados en nuestro laboratorio, las ondas catalíticas son altamente sensibles a la presencia de surfactantes, disolventes

orgánicos, etc. La supresión de la señal en presencia de este tipo de compuestos se debe a la competencia del analito e interferente por los sitios de adsorción en la superficie del electrodo. Tomando en cuenta la compleja composición de las aguas residuales, se propuso llevar a cabo el tratamiento “clean-up” por extracción en fase sólida con el fin de eliminar los posibles interferentes y preconcentrar el analito antes de la etapa de determinación electroanalítica. Con este esquema, la matriz química de la muestra cambia drásticamente, siendo ahora el disolvente utilizado en la etapa de elución del MBT el componente mayoritario de la solución. Así que, en primer lugar se estudió el efecto del acetato de etilo y del acetonitrilo (que pudieran ser utilizados para eluir los compuestos retenidos en el cartucho de SPE) en la señal catalítica del MBT en presencia del ácido trifluoroacético y ácido fosfórico. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 29, donde se observa que, independientemente del ácido utilizado, existe una disminución significativa en la señal analítica conforme se incrementa la cantidad de solvente orgánico adicionado a 20 ml de la solución MBT-ácido. Sin embargo, los efectos observados en presencia del ácido trifluoroacético fueron menos drásticos, lo que confirma la selección adecuada del TFA para los análisis. Por otro lado, el acetonitrilo tuvo un efecto menos notorio, por lo que este disolvente fue seleccionado para la elución de los compuestos retenidos en el cartucho C18. A continuación, se llevó a cabo la extracción en fase sólida de una muestra de agua de desecho municipal de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 12 (sección 4.1, elución con acetonitrilo). En la celda electroanalítica se añadieron 10 ml de agua desionizada, 100 µl de muestra (extracto SPE) y 500 µl de la solución de TFA para obtener su concentración final de 25.0 mmol·l⁻¹ (detalles instrumentales en la Tabla 16). En este experimento no se obtuvo la señal de onda catalítica de protones. Seguidamente, se adicionaron de 400 µl de un estándar de MBT (100.0 mg·l⁻¹) y aún así no se presentó ninguna señal analítica. Estos resultados demuestran que el procedimiento SPE no fue eficiente en la eliminación de los posibles interferentes en la determinación voltamperométrica. La presencia del acetonitrilo y de los componentes de la muestra retenidos en el cartucho junto con el MBT provocó la supresión total de la señal de una concentración del analito muy por encima de la que se puede esperar en las muestras reales. Por ello, se descartó definitivamente la posibilidad de emplear el procedimiento voltamperométrico en la determinación de MBT en muestras medio ambientales.

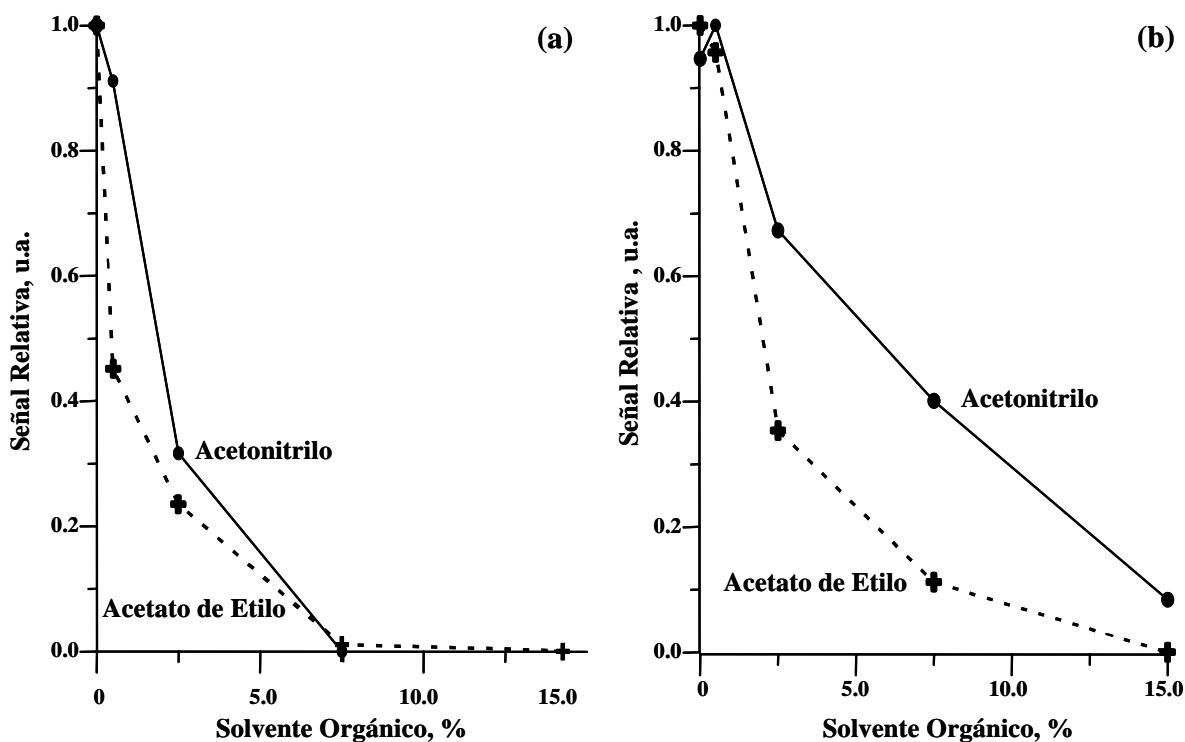


Figura 29. Efecto del (—) acetonitrilo y del (- - -) acetato de etilo en la magnitud de la señal de onda catalítica de protones generada por $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT en presencia de $25.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de (a) ácido fosfórico y (b) trifluoroacético.

4.4 Aplicación de la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en el análisis de benzotiazoles

En la revisión bibliográfica (Tabla 4) se encontraron muy pocos reportes sobre el uso de la cromatografía de gases en el análisis de los benzotiazoles. En particular, casi todas las aplicaciones se enfocaron en la detección y/o determinación del MBT. Para convertir este compuesto en una especie volátil, Manninen y col. [38] llevaron a cabo su derivatización con pentafluorobencilbromuro (PFBB). Con este procedimiento, el límite de detección obtenido en el análisis de orina fue de $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y el MBT fue detectado en las orinas de ratones expuestos al TCMTB. De acuerdo con la bibliografía [80], el pentafluorobencilbromuro puede ser empleado en la derivatización de tioles, alcoholes, ácidos y aminas (Figura 10). Basándose en las estructuras químicas de los compuestos considerados en este estudio, la derivatización pudiera ser eficiente para el MBT, MBO y PCF. Cabe resaltar que, en aguas de desecho de la ciudad León, Gto. se puede esperar la presencia del MBT y PCF, como resultado del uso de los fungicidas en el tratamiento de las

pieles. Además, la derivatización del MBO en las mismas condiciones de los analitos permite su uso como un estándar interno.

Para verificar la factibilidad de la derivatización del MBT y MBO, se preparó una solución estándar (50 ml) conteniendo $134.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT y $60.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBO. A continuación, la muestra fue preconcentrada empleando un cartucho SepPak-Plus C18 (procedimiento en la Figura 12, elución con acetato de etilo) y posteriormente, se llevó a cabo la reacción de derivatización utilizando las condiciones experimentales presentadas en la Figura 30 [3]. La solución obtenida fue introducida al cromatógrafo de gases.

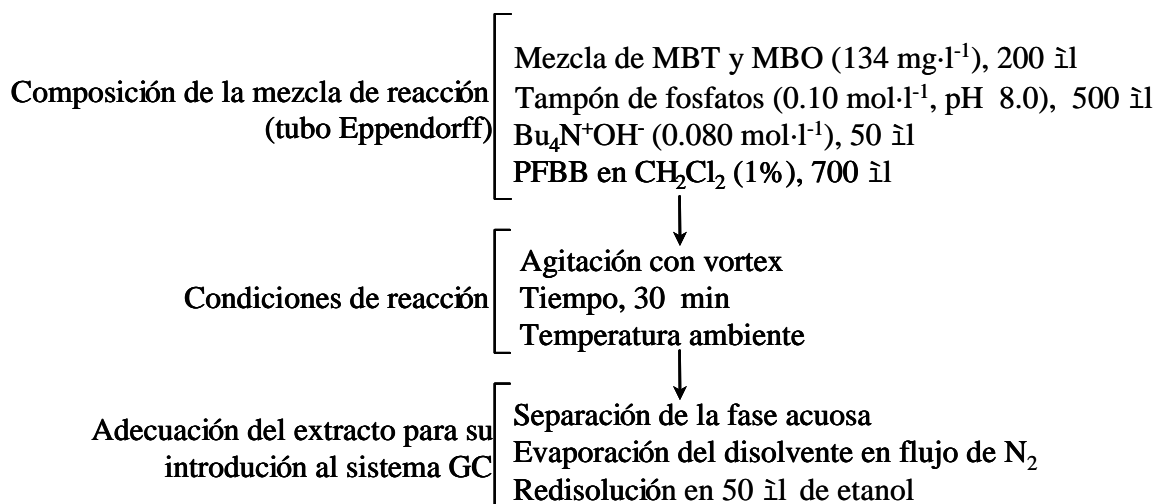


Figura 30. Esquema del procedimiento de derivatización con PFBB.

Tabla 17. Condiciones instrumentales en la separación/detección de los benzotiazoles por GC-MS.

Columna	CP-SIL 8 CB de sangrado bajo/MS (30m, i.d. 0.25 mm, grosor de la película de fase estacionaria 0.25 µm)			
Fase móvil	Helio			
Flujo	$1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$			
Inyección	Sin split			
Temperatura del inyector	250° C			
Volumen introducido	1 µl			
Programa de temperatura	Temperatura, ° C	° C·min ⁻¹	“Hold”, min	Tiempo, min
	80	-	0.5	0.5
	150	20	1.5	5.5
	270	10	7.5	25.0
Modo de ionización	Impacto de electrones			
Acumulación de iones	331 ± 3, 347 ± 3			

Con el fin de aumentar la selectividad y sensibilidad de detección, en la trampa iónica se llevó a cabo la acumulación de iones con dos ventanas de m/z correspondientes a los valores esperados de masa de los tioéteres del MBO y MBT (331 ± 3 y 347 ± 3 , respectivamente). Las condiciones de separación y detección se resumen en la Tabla 17.

En la Figura 31a, donde se presentan los cromatogramas obtenidos, se observa la elución de dos compuestos con los tiempos de retención de 13.8 min y 15.7 min. Los picos cromatográficos (Fig. 31 a) presentaron un factor de asimetría mayor que 1.5 (considerando 10% de altura) debido a que la columna utilizada no fue específica para el análisis de compuestos de azufre. Sin embargo, los espectros de masas obtenidos para cada uno de los picos (Figura 31b) permitieron identificar los compuestos como los tioéteres del MBO y MBT, confirmando la viabilidad del procedimiento para los fines analíticos. Las ecuaciones de la reacción de derivatización obtenida se presentan en la Figura 32.

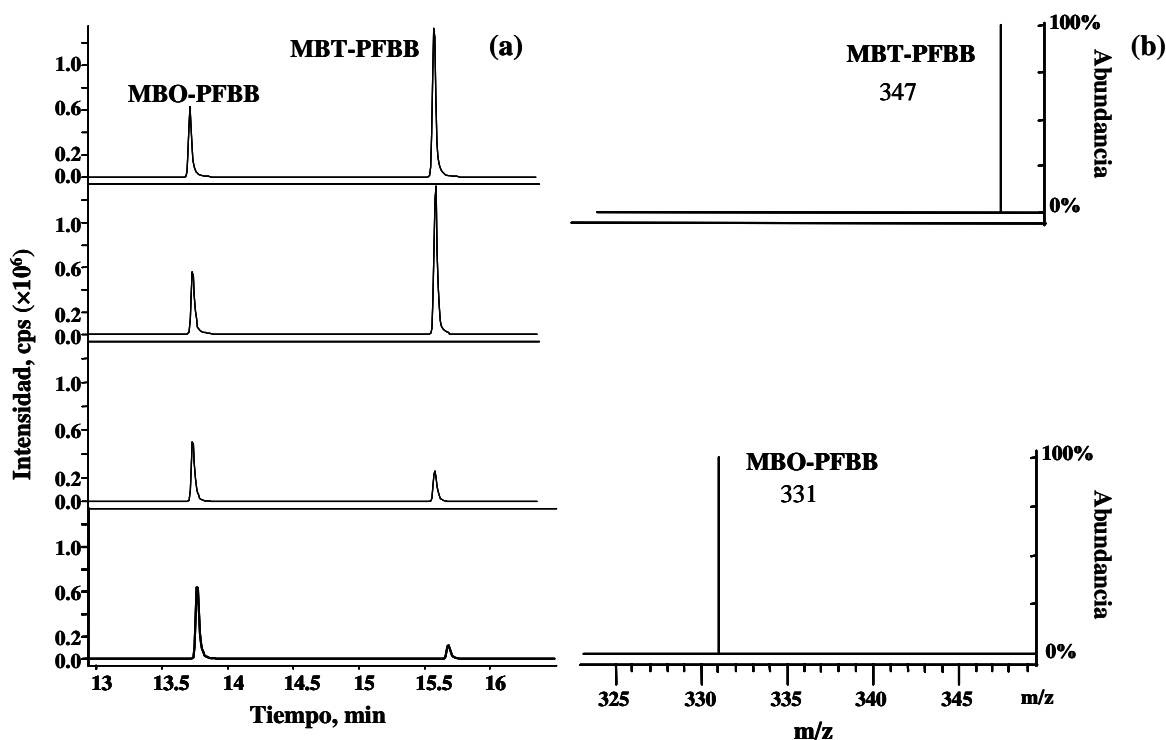


Figura 31. Cromatogramas GC-MS (SIM) de la mezcla de estándares del MBO y MBT obtenidos después de la derivatización con PFBB (a) y sus respectivos espectros de masas (b). (Las condiciones instrumentales se detallan en la Tabla 17)

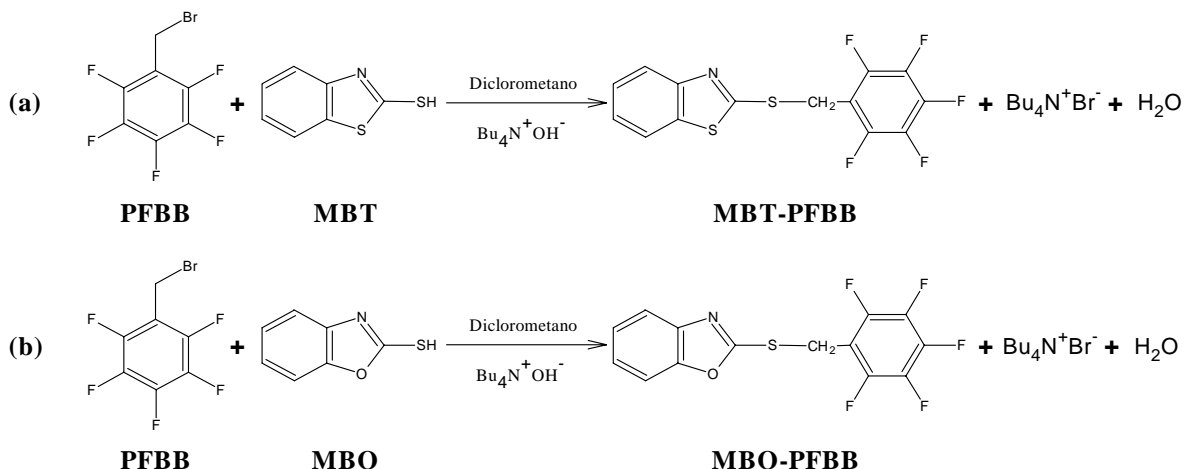


Figura 32. Ecuaciones de la reacción de derivatización del (a) MBT y (b) MBO con PFBB.

En la Figura 31 se presentan también los cromatogramas obtenidos en el proceso de calibración. Para ello, se prepararon y analizaron cinco soluciones estándar (50 ml) conteniendo 0.0, 17.0, 34.0, 67.0 y 134.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MBT (concentración del MBO constante, 60.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Tomando como señal analítica la relación entre alturas de los picos del MBT-PFBB y MBO-PFBB se obtuvo la función de calibración para el MBT ($y = 0.0027x - 0.0184$, $r^2 = 0.9998$) y se evaluó el límite de detección $\text{LD} = 5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Es necesario destacar que, gracias a la acumulación selectiva de iones en un tiempo relativamente largo (tiempo de integración 0.8 segundos), el detector de trampa iónica permite obtener una mejor sensibilidad de la determinación, respecto al detector donde se utiliza el cuadruplo (análisis en tiempo real). Esta ventaja de la trampa iónica se observa en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que el límite de detección $\text{LD} = 5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ resultó cuatro veces más bajo que el reportado por Manninen A. y col., quienes para el mismo análisis utilizaron un analizador de masas de cuadrupolo ($\text{LD} = 20.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) [38].

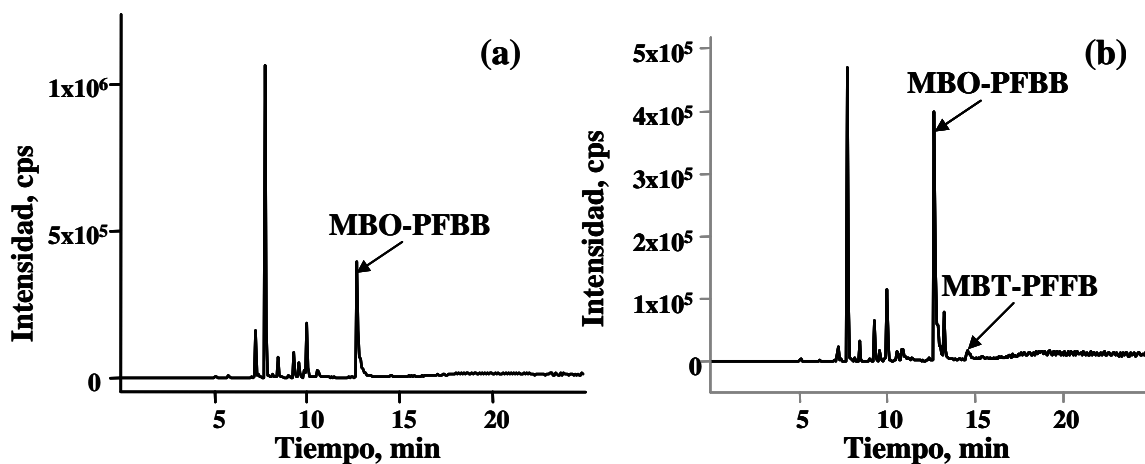
Una vez establecidas las condiciones para el análisis cuantitativo de MBT, se intentó obtener el éter del PCF con PFBB, utilizando una concentración de pentafluorobencilbromuro al 1.0 %. Para evitar la detección del reactivo de derivatización y de sus productos de hidrólisis, el cromatograma fue registrado con acumulación de iones en la ventana de m/z 250 – 450. Para cada uno de los picos cromatográficos se obtuvieron los espectros de masas. En estos espectros no se presentó el ión con m/z de aproximadamente 446, correspondiente a la masa molecular del PCF-PFBB. En consecuencia, de los

compuestos de interés para este estudio, solamente el MBT y el MBO formaron derivados con el PFBB.

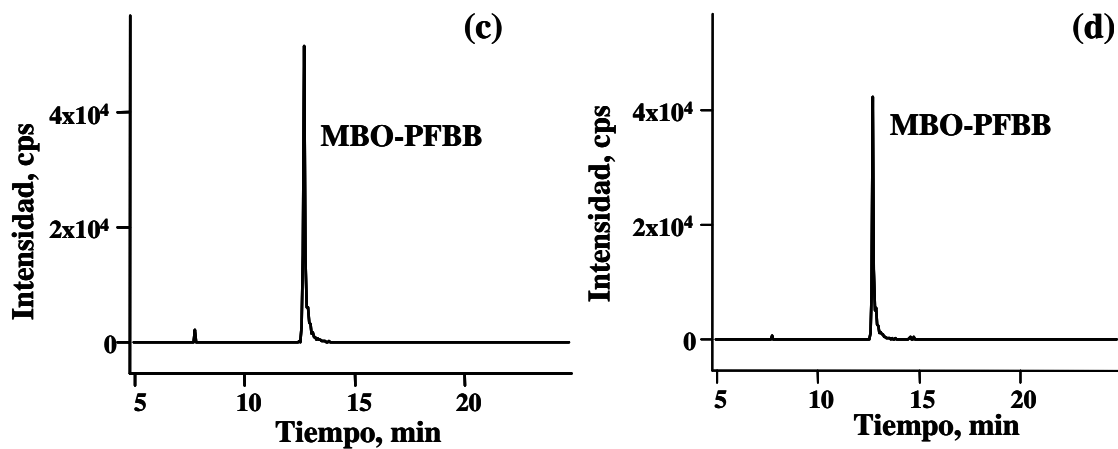
Para el análisis de MBT en agua de desecho, en primer lugar se llevó a cabo la extracción en fase sólida en el cartucho C18 y, después de la elución de compuestos retenidos se obtuvo la derivatización con pentafluorobencilbromuro. En estas dos etapas se utilizaron las mismas condiciones que para la mezcla de estándares. En paralelo, se llevó a cabo el análisis de una muestra enriquecida adicionando los estándares de MBT y MBO después de la etapa de SPE (las concentraciones finales de MBT y MBO fueron 0.60 y 60.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente). En la Figura 33 se presentan cromatogramas GC-MS obtenidos en diferentes condiciones de detección para la muestra sin adición de estándares (Fig. 33 a, c, e) y para la muestra enriquecida (Fig. 33 b, d, f). Los cromatogramas (a) y (b) se registraron con acumulación selectiva de iones en la ventana de m/z 250-450, los cromatogramas (c) y (d) corresponden a la detección con la ventana de $m/z = 331 \pm 3$ y los cromatogramas (e) y (f) a la ventana $m/z = 347 \pm 3$.

En primer lugar se intentó interpretar los cromatogramas (a) y (b) y los respectivos espectros de masas. En base a los valores de m/z de los compuestos eluidos de la columna y comparación de perfiles de elución sin y con fortalecimiento de muestra con MBT y MBO. Se logró asignar los picos eluidos con tiempos de retención de 12.7 min y 14.6 min a MBO-PFBB y MBT-PFBB, respectivamente. La presencia de los otros picos cromatográficos, debe adscribirse a la falta de selectividad en la etapa de SPE, donde se obtuvo la retención de varios componentes de la muestra original, de los cuales algunos fueron volátiles o formaron especies volátiles con PFBB. En la asignación de tales picos cromatográficos se compararon sus tiempos de retención, los valores m/z y los espectros de masa con los datos incluidos en la biblioteca NIST. Debido a la utilización de una instrumentación diferente en este trabajo (trampa iónica) y la que fue utilizada para registrar los espectros NIST (cuadrupolo), la asignación de los picos fue difícil y poco confiable. En la búsqueda en la base de datos NIST se encontraron varios compuestos para cada uno de los picos cromatográficos obtenidos, por lo que no se logró la identificación definitiva de todos los compuestos.

Cromatogramas (m/z en el intervalo 250-450)



Cromatogramas (m/z: 331)



Cromatogramas (m/z: 347)

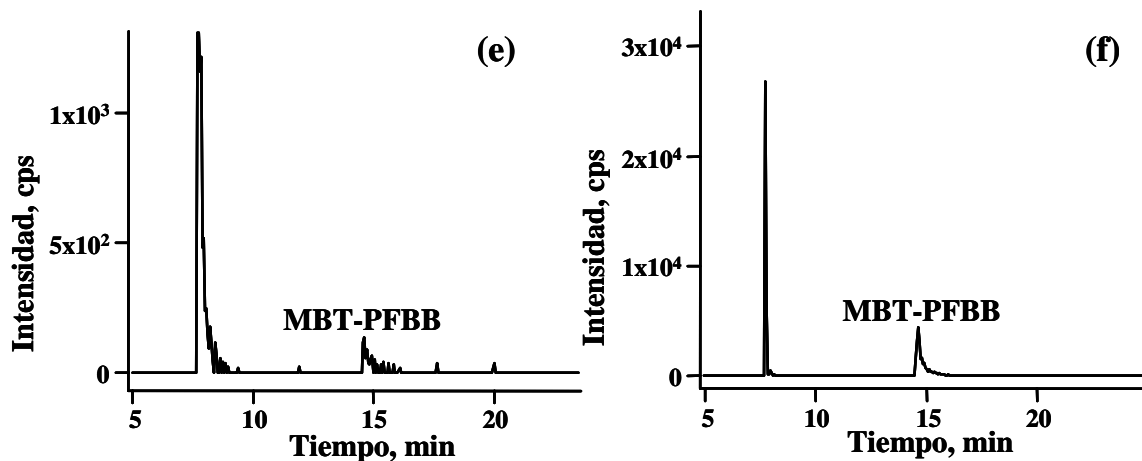


Figura 33. Cromatogramas GC-MS del agua residual (a, c, e) y agua residual enriquecida con MBT y MBO (b, d, f) registrados en diferentes condiciones de detección.

Para confirmar la presencia de MBT y mejorar las condiciones de detección para el MBO, los cromatogramas de agua residual sin y con adición de estos compuestos fueron procesados para obtener información selectiva, correspondiente a la acumulación de iones en las ventanas $m/z = 331 \pm 3$ (Fig. 33 c y d) y $m/z = 347 \pm 3$ (Fig. 33 e, f). Lógicamente, en los cromatogramas presentados en la Fig. 33 c y d se observa la elución de un solo compuesto MBO-PFFB, con tiempo de retención 12.7 min y m/z 331. En los cromatogramas de la Figura 33 e y f, aparece el pico con el tiempo de retención 14.6 min y m/z 347, siendo su intensidad más alta en el cromatograma de agua enriquecida. Estos resultados confirman la presencia del MBT en la muestra analizada. La sensibilidad del procedimiento no es suficientemente alta para llevar a cabo el análisis cuantitativo. Se puede estimar que, el nivel de MBT en agua de desecho es de orden de límite de detección, es decir aproximadamente 5.0 g l^{-1} , lo que parece confirmar el resultado obtenido en la misma muestra por el procedimiento más sensible de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (1.9 g l^{-1}).

Capítulo 5. Conclusiones

El enfoque de este trabajo fue hacia el desarrollo de procedimientos analíticos que pudieran ser útiles en la evaluación del impacto medio ambiental generado por el uso de los fungicidas en la industria curtidora en León, Gto. Los compuestos de interés fueron dos fungicidas actualmente en uso: el 2-[(tiocianometil)tiol]-benzotiazol (TCMTB) y el pentaclorofenol (PCF), así como los productos de degradación del TCMTB: 2-mercaptobenzotiazol (MBT), 2-metiltiobenzotiazol (MTBT) y benzotiazol (BT). El compuesto seleccionado como un posible estándar interno fue el 2-mercaptobenzoxazol (MBO). Con base en las propiedades de estos compuestos y de las muestras a analizar, así como en los resultados de estudios anteriores, se consideraron las siguientes etapas del procedimiento: (i) tratamiento de tipo “clean-up”, (ii) preconcentración de los analitos, (iii) separación y (iv) detección/cuantificación. Consecuentemente, las técnicas analíticas empleadas en el estudio fueron: la extracción con disolventes, la extracción en fase sólida (SPE), la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP HPLC) con detección espectrofotométrica y amperométrica, la voltamperometría adsorptiva de redisolución catódica y la cromatografía de gases con detección por espectrometría masas (GC-MS). Los resultados obtenidos en cada una de las etapas del trabajo permitieron formular una serie de conclusiones que se describen a continuación.

5.1 Análisis de benzotiazoles y de PCF por HPLC con detección espectrofotométrica

Se definieron las condiciones de separación cromatográfica en fase inversa, obteniéndose la resolución de los seis compuestos en 9 minutos (tiempos de retención de MBO, MBT, BT, TCMTB, MTBT y PCF respectivamente 2.98, 3.32, 4.05, 5.62, 6.16 y 7.94 min). La fase móvil fue la solución diluida del ácido acético (0.02%) : acetonitrilo (34:66) y la elución fue isocrática. El criterio empleado en la selección de las condiciones de detección espectrofotométrica fue el mayor valor posible del parámetro señal/ruido. Así, la detección del MBT se realizó en 324 nm y para el resto de los compuestos se utilizó la longitud de onda 280 nm. Los parámetros analíticos evaluados demostraron la viabilidad del procedimiento para la cuantificación de los compuestos de interés en las concentraciones del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (la peor sensibilidad fue obtenida para PCF).

En la aplicación al análisis del agua de desecho, se llevó a cabo la extracción en fase sólida en cartuchos de fase inversa. Se logró la detección del MBT, BT y PCF en la muestra. Además, los resultados de los experimentos de recuperación sugirieron la viabilidad de la preconcentración del MBT, TCMTB y PCF por evaporación del acetonitrilo en la solución obtenida después del tratamiento SPE.

En esta parte de trabajo no se obtuvieron los resultados cuantitativos debido a: (i) falta de selectividad en la etapa de SPE, (ii) co-elución de varios compuestos en la región de elución de MBT y MBO y (iii) relativamente baja sensibilidad de la detección espectrofotométrica.

Con el fin de superar las limitaciones de la detección espectrofotométrica en 280 y 324 nm, se llevó a cabo la derivatización del MBT y del MBO con 4-cloro-7-nitrobenzofurazona (NBD-Cl). En las condiciones de reacción seleccionadas experimentalmente se confirmó la selectividad de la derivatización para MBT y MBO. Los derivados formados no presentaron fluorescencia en la región de excitación 280 – 400 nm, pero si presentaron una nueva banda de absorción permitiendo llevar a cabo su detección en 390 nm. Se demostró que, el procedimiento de derivatización pre-columna con NBD-Cl ofrece dos importantes ventajas para el análisis de MBT en aguas residuales por RP HPLC. En primer lugar los compuestos derivados (MBO-NBD y MBT-NBD) son menos polares y se eluyen de la columna en la región libre de interferencias observadas. Por otra parte, la detección de los compuestos derivados puede llevarse a cabo en la longitud de onda mayor con mejor selectividad respecto a las longitudes de onda utilizadas para MBT y MBO (aumento de S/N). Entre las limitaciones del procedimiento de derivatización pre-columna hay que mencionar que el NBD-Cl no reacciona con otros compuestos de interés en este estudio. Al incluir la etapa de derivatización, el procedimiento analítico se hace más complejo con el riesgo de una peor precisión y exactitud de los resultados finales para otros analitos. Por lo tanto, dicho procedimiento no se aplicó a las muestras reales.

5.2 Aplicación de la detección amperométrica en la determinación del MBT por HPLC en muestras ambientales y clínicas

Esta parte de trabajo es la primera aplicación de la detección electroquímica en la determinación de benzotiazoles que contienen en su estructura el grupo funcional –SH. En los experimentos por voltamperometría cíclica se demostró la viabilidad de la detección amperométrica oxidativa del MBT y MBO en presencia de un electrolito soporte simulando la composición de la fase móvil utilizada en la separación cromatográfica.

En los estudios sistemáticos se definieron las condiciones de separación cromatográfica, compatibles con la detección amperométrica. Estas condiciones resultaron ligeramente diferentes respecto a las utilizadas con la detección espectrofotométrica (ácido fosfórico 3 mmol l⁻¹ : acetonitrilo (1:1), elución isocrática).

En el estudio sobre las condiciones de detección más adecuadas, se tomaron en cuenta el material del electrodo de trabajo (oro y carbón vítreo), el tamaño del electrodo (área de la superficie 28 mm² y 113 mm²) y el potencial aplicado (600, 900, 1250 mV). El uso del electrodo de oro permitió obtener mayores señales de MBO y MBT. Sin embargo, en las corridas consecutivas se observó la pasivación de la superficie de oro, el efecto fue reportado por otros autores en presencia de compuestos organosulfurados o sus productos de oxidación [60]. Se establecieron las condiciones de regeneración del electrodo (reducción catódica), pero aumentando de manera considerable el tiempo total del análisis (de 8 min a 12 min). Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con diferentes electrodos de carbón vítreo permitieron seleccionar para fines analíticos el electrodo con área de superficie 113 mm² y el potencial de detección 1250 mV. En estas condiciones se obtuvo el límite de detección para MBT 1.0 µg·l⁻¹.

En la aplicación del procedimiento desarrollado al análisis de una muestra real, se logró detectar el MBT en agua de desecho. La cuantificación se llevó a cabo por el método de adición de estándar y por calibración externa obteniéndose resultados de 1.9 µg·l⁻¹ y 1.6 µg·l⁻¹, respectivamente. La discrepancia entre estos valores (15%) sugiere la presencia de interferencias de matriz, siendo el resultado obtenido por adición de estándar el más confiable.

La segunda aplicación del procedimiento desarrollado fue para el análisis del MBT en orina. En este caso, el MBT y MBO fueron detectados solamente en muestras fortificadas, observándose una importante supresión de sus señales (la magnitud de los picos cromatográficos fue inferior respecto a las señales observadas en el análisis de estándares puros). Aunque el uso de la detección amperométrica del MBT y MBO en orina parece viable, se necesitan más estudios para elucidar la fuente de interferencias observadas y lograr su posible eliminación.

5.3 Estudio sobre la posible aplicación de la voltamperometría adsorptiva de redisolución catódica en la determinación del MBT en aguas de desecho

En la continuación de la investigación realizada anteriormente [1] se estudiaron varios parámetros que pudieran ayudar a eliminar las interferencias observadas en la determinación del MBT basada en la formación de la onda catalítica de protones. Se examinó el efecto del tipo y concentración del ácido, encontrándose la mayor magnitud de la señal voltamperométrica en presencia del ácido trifluoroacético ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Para evitar las interferencias provocadas por la compleja composición de la muestra real, se propuso llevar a cabo una etapa de pretratamiento de la muestra por SPE. Tomando en cuenta la fuerza de elución del MBT del cartucho C18 y el efecto en la señal de la onda catalítica de protones, el acetonitrilo fue seleccionado como el disolvente más adecuado. En las pruebas realizadas para el análisis de agua de desecho (sin y con fortificación de la muestra) se observó la supresión total de la señal de la onda catalítica de protones.

5.4 Análisis del MBT por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas

Para convertir los analitos en compuestos volátiles, se propuso la derivatización pre-columna con pentafluorobencilbromuro (PFBB), que pudiera ser eficiente para el MBT, MBO y PCF. Los experimentos realizados en las soluciones estándar demostraron la derivatización selectiva del MBT y MBO. El procedimiento propuesto para el análisis de aguas de desecho consistió en las siguientes etapas: extracción en fase sólida (cartucho C18), derivatización con PFBB y separación/detección por GC-MS. Para aumentar la sensibilidad y selectividad de la detección, en el analizador de masas de trampa iónica se utilizaron las ventanas de acumulación de iones correspondientes a los valores m/z

esperados para los tioéteres del MBO y MBT (331 ± 3 y 347 ± 3). Tomando como señal analítica la relación entre las alturas de los picos de MBT-PFBB y MBO-PFBB, el límite de detección obtenido para el MBT fue de $5.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, aumentando de esta manera la sensibilidad respecto al único método por GC-MS reportado hasta la fecha [38]. En el análisis de muestra real, se detectó la presencia de MBT con la concentración aproximada de $5.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Este resultado confirma el resultado obtenido en la misma muestra con el uso de un procedimiento más sensible por HPLC con detección electroquímica.

5.5 Conclusiones generales

En cuanto a las conclusiones generales del trabajo es necesario destacar las siguientes:

- a) La cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, con detección espectrofotométrica parece ser una herramienta más versátil para el análisis de benzotiazoles y de pentaclorofenol. La etapa más crítica en el procedimiento analítico es el pretratamiento de la muestra para lograr la separación y preconcentración selectiva de los analitos. En el posible trabajo futuro será necesario estudiar más a fondo las condiciones de esta etapa.
- b) Para la determinación del MBT en agua de desecho se propusieron dos procedimientos analíticos, con el mismo estándar interno, pero basados en diferentes fundamentos fisicoquímicos: (i) extracción líquido-líquido y la separación por cromatografía líquida con detección electroquímica y (ii) extracción en fase sólida, derivatización con PFBB y la separación por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas con analizador de masas de trampa iónica. El desarrollo del primer procedimiento (i) forma la contribución científica más importante del trabajo, mientras que el segundo (ii) fue una adaptación del procedimiento reportado en la bibliografía [38]. Se demostró la viabilidad de los dos sistemas para el análisis del MBT en aguas residuales ((i) también para el análisis de orina) observándose mejor sensibilidad del análisis cuantitativo por la cromatografía líquida. La concordancia entre los resultados obtenidos en el análisis de la misma muestra real (resultado semi-cuantitativo en GC-MS) indica la exactitud del análisis cromatográfico con detección electroquímica.

Bibliografía

1. Hinojosa-Reyes L., Tesis de Maestría, Posgrado Institucional en Química, Universidad de Guanajuato, 2001.
2. Hinojosa Reyes L., Wróbel K., Wrobel K., *Talanta*, **56** (2002) 515.
3. Hinojosa Reyes L., Wróbel K., Wróbel K., Determination of 2-[(Tiocianometil)tiol]-benzotiazole (TCMBT) and 2-mercaptobenzothiazole (MBT) in Chrome Tanning Liquors Using derivative Absorption Spectra and Partial Least Squares Regression (PLS2), *Journal of American Leather Chemist Association*. Aceptado.
4. Calnan C. N., *Fungicides used on leather*, The Leather Conservation Center, 34, Guilghall Road, Northampton (1985).
5. Bellavia V. et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000) 1239.
6. Budavari S., *The Merck Index – An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, Eleventh Edition, Merck & Co., Inc., 1989.
7. www.lactose.co.uk/foodallergies/chemallergensprint.html
8. www.envirosmart.com.au/water/chlorine.htm
9. www.hampfordresearch.com/techdatasheet/2-mbo.doc
10. Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G. & Jekel M., *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995) 478.
11. De Vos D., De Wever H. & Verachtert H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39** (1993) 622.
12. De Wever H. & Verachtert H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42** (1994) 623.
13. De Wever H., Besse P. & Verachtert H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57** (2001) 620.
14. De Wever H., Vereecken K., Stoltz A. & Verachtert H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64** (1998) 3270.
15. Hendricks A. J. et al, *Water Res.*, **28** (1994) 581.
16. Moore R.A. & Karasek F.W., *J. Environ. Anal. Chem.*, **17** (1984) 203.
17. Browlee B. et al., *Sci. Ser. Can.*, **126** (1981) 1.
18. Fielding M. et al., *Water Res. Cent.*, (1981) 49.
19. Headly J.V., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **14** (1987) 275.

20. Martinez K., Ferrer I., Hernando M.D., Fernández-Alba A. R., Marce R.M, Borrul F. & Barceló D., *Environ. Tech.*, **22** (2001) 543.
21. Evans J. J., Shoemaker C.K. & Klesius P.H., *Mar. Environ. Res.*, **50** (2000) 257.
22. www.ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_H&S/NTP_Chem1/Radian149-30-4.html
23. Teschke K., Hertzman C., Wiens M., Dimich-Ward H., Hershler R., Ostry A. & Kelly S. J., *Am. J. Ind. Med.*, **21** (1992) 375.
24. Zina A.M., Bedello P.G., Cane D., Bundino S., & Benedetto A., *Contact Dermatitis*, **17** (1987) 17.
25. Emmet E.A., Risby T.H., Taylor J., Chen C.L., Jiang L. & Feinman S.E., *Contact Dermatitis*, **30** (1994) 85.
26. Jung J.H., McLaughlin J.L., Stannard J. & Guin J. D., *Contact Dermatitis*, **19** (1988) 254.
27. Kaniwa M.A., Isama K., Nakamura A., Kantoh H., Itoh M., Miyoshi K., Saito S. & Shono M., *Contact Dermatitis*, **30** (1994) 26.
28. Saha M., Srinivas C.R., Shenoy S.D., Balachandran C. & Acharya S., *Contact Dermatitis*, **28** (1993) 260.
29. Reepmeyer J.C. & Juhl Y.H., *J. Pharm. Sci.*, **72** (1983) 1302.
30. Airaundo C.B., Gayte-Sorbier A., Momburg R. & Laurent P., *J. Chromatogr.*, **354** (1986) 344.
31. Gaind V.S. & Jedrzejczak K., *J. Anal. Toxicol.*, **17** (1993) 34.
32. Airaundo C.B., Gayte-Sorbier A., Momburg R. & Laurent P., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **1** (1990) 231.
33. Petersen M.C., Vine J., Ashley J.J. & Nation R.L., *J. Pharm. Sci.*, **70** (1981) 1139.
34. Salmona G., Assaf A., Gayte-Sorbier A. & Airaundo C. B., *Biomed. Mass. Spectrom.* **11** (1984) 450.
35. Meek J.H. & Pettit B.R., *Lancet*, **2** (1985) 8464.
36. EPA. Method 637. The determination of MBTS and TCMTB in municipal and industrial wastewaters.
37. Liska I., *J. Chromatogr. A.*, **885** (2000) 3.

38. Manninen A., Auriola, S., Vartiainen, M., Liesivuori, J., Turunen, T. & Pasanen, M., Arch. Toxicol., **70** (1996) 579.
39. Fiehn O., Wegener G., Jochimsen J. & Jekel M., Water Res., **32** (1998) 1075.
40. Reetsma T., Putschew A. & Jekel M., Waste Management, **19** (1999) 181.
41. Reetsma T., Fiehn O. & Jekel M., Fresenius J. Anal. Chem., **363** (1999) 771.
42. Slobodník J., Ramalho S., van Baar L.M.B., Louter A.J.H. & Brinkman U.A.T., Chemosphere, **41** (2000) 1469.
43. Geerdink R. B., Kooistra-Sijpersma A., Tiesnitsch, J., Kienhuis, P. G. & Brinkman, U. A., J. Chromatogr. A., **863** (1999) 147.
44. Thomas K.V., J. Chromatogr. A, **825** (1998) 29.
45. Ferrer I. & Barcelo D., J. Chromatogr. A., **854** (1999) 197.
46. Aguera A., Piedra, L., Hernando, M. D., & Fernandez-Alba A. R., J. Chromatogr. A, **889** (2000) 261.
47. Martinez K., Ferrer I. & Barcelo D., J. Chromatogr. A, **879** (2000) 27.
48. Martinez K., Ferrer I., Hernando M. D., Fernandez-Alba A. R., Marce R. M., Borrull F. & Barcelo D., Environ. Technol., **22** (2001) 543.
49. Reemtsma T., Rapid. Commun. Mass. Spectrom., **14** (2000) 1612.
50. Dean J.R., Extraction Methods for Environmental Analysis., John Wiley & Sons Ltd., 1998.
51. Skoog D.A., Holler F.J. & Nieman T.A., Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Saunders College Publishing, 1998.
52. Anal. Chem., **54** (1982) 327A.
53. Blau K. & Halket J., Handbook of Derivatives for Chromatography, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., 1993.
54. Poole C.F. & Poole S.K., Chromatography Today, Elsevier, 1991.
55. LaCourse R.W., Pulsed Electrochemical Detection in High Liquid Chromatography, John Wiley & Sons Inc., 1997.
56. Vandenberg P.J. & Jonson D.C., Anal. Chem., **65** (1993) 2713.
57. Tudos A.J. & Jonson D.C., Anal. Chem., **67** (1995) 557.
58. Liu A., Li T & Wang E., Anal. Sci., **11** (1995) 597.

59. LaCourse W.R. & Owens G.S., *Anal. Chim. Acta*, **307** (1995) 301.
60. White P.C., Lawrence N.S., Davis J. & Compton R.G., *Electroanalysis*, **14** (2002) 89.
61. Carvalho, Remiao, Timbrell, Bastos & Ferreira, *Biomed. Chromatogr.*, **8** (1994) 134.
62. D'Eramo J. L., Finkelstein A. E., Boccazzi F. O. & Fridman O., *J. Chromatogr. B*, **720** (1998) 205.
63. Gogia R., Richer S. P. & Rose R.C., *Curr. Eye Res.*, **17** (1998) 257.
64. Vandeberg P. J. & Jonson D. C., *Anal. Chim. Acta*, **290** (1994) 317.
65. Owens G. S. & LaCourse W. R., *J. Chromatogr. B*, **695** (1997)15.
66. Tudos A. J., Vandeberg P. J. & Johnson D. C., *Anal.Chem.*, **65** (1993) 2713.
67. Jovanovic T. S. & Stanovic B. S., *Acta Pharm. Jugoslavica.*, **39** (1989) 117.
68. Johll M. E., Williams D. G. & Jonson D. C., *Electroanalysis*, **9** (1997) 1397.
69. Vandeberg P. J. & Jonson D. C., *Anal. Chem.*, **64** (1994) 2713.
70. LaCourse W. R. & Owens G. S., *Anal. Chim. Acta*, **307** (1995) 301.
71. Fry A.J., *Synthetic Organic Electrochemistry*, Harper & Row Publishers, 1972.
72. Calusaru A., *Analyst*, **115** (1990) 1223.
73. Kissinger P.T. & Heineman W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Second Edition, 1996.
74. Fogg A.G., Ismail R., Ahmad R. & Banica F.G., *Analyst*, **121** (1996) 1877.
75. Fogg A.G., Ismail R., Ahmad R. & Banica F.G., *Talanta*, **44** (1997) 491.
76. Delahay P., *New Instrumental Methods in Electrochemistry*, Robert E. Krieger Publishing Company,1980.
77. White R.E., Bockris J.O'M., Conway B.E. & Yeager E., *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*, Volume 8, Plenum Press, 1984.
78. Wang J., Zadeii J. & Shan-Lin M., *J. Electroanal. Chem.*, **237** (1987) 281.
79. Willard H.H., Merrit L.L., Dean J.A. & Settle F.A., *Métodos Instrumentales de Análisis*, Grupo Editorial Iberoamericana,1991.
80. Skoog D.A. & Leary J.J., *Análisis Instrumental*, Cuarta Edición, Editorial McGraw-Hill,1994.
81. Danielson N.D., Gallagher P.A. & Bao J.J., *Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Análisis en Encyclopedia of Analytical Chemistry – Applications, Theory and Instrumentation*, Volume 8, John Wiley & Sons Ltd., 2000.

Bibliografía

82. Wang J., *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH Publishers, 1988
83. Vandeberg P.J. & Jonson D.C., *Anal. Chem.*, **65** (1993) 2713.
84. Jhonson D.C. & LaCourse W.R., *Anal. Chem.*, **62**, (1990) 589A.