



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**Reporte final para obtener
Diploma de Especialidad en Biotecnología**



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

Biodegradación Anaerobia del Acido Tereftálico

Presentó

Jesús Gerardo Betancourt Mora

Asesores:

M. en C. Oscar Monroy Hermosillo

Dr. Jean Pierre Guyot

Realizado en:

Depto. de Biotecnología

Lab. de Microbiología Ambiental

Durante 1994 - 1995

Iztapalapa, D. F. a 23 de Octubre de 1995

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES, POR TODO SU APOYO Y CONFIANZA.

A MI HERMANA PATY, POR SU EJEMPLO.

**POR MIS HERMANOS RAUL Y ALEJANDRO,
SIEMPRE LOGREN SUS METAS.**

**PROFESOR OSCAR, GRACIAS POR DARME
LA OPORTUNIDAD DE TRABAJAR EN SU LABORATORIO.**

**JEAN PIERRE, GRACIAS POR CONFIARME ESTA
PARTE DEL PROYECTO.**

**GRACIAS A LOS PREFESORES HERVE MACARIE,
FLORINA RAMIREZ, MONICA MERAZ, MARGARITA SALAZAR Y
CARMEN FAJARDO, POR ASESORARME DURANTE MI TRABAJO.**

**GRACIAS A TODOS MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL:**

**MARGARITA, MARICELA, ACELA, ISELA, GRACIELA,
NORMA, ALEJANDRA, JACOBO, AGUSTIN T., DANIEL V., DANIEL
Z., MARTIN, ESTEBAN Y RODOLFO.**

OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de biodegradación en anaerobiosis de un compuesto recalcitrante de la industria petroquímica.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer el grado de biodegradación del ácido tereftálico a través de la producción de metano resultante.

Montar la técnica por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) para determinar ácido tereftálico, y sus análogos (4-carboxibenzaldehído, p-toluico y benzoico).

PLAN DE TRABAJO.

Primer trimestre:

Se realizó una prueba de biodegradabilidad en anaerobiosis estricta, probando concentraciones de 20 y 60 mg/L del compuesto aromático, y se determinó la producción de metano por cromatografía de gases (CG).

Segundo trimestre:

Se montó la técnica en HPLC para cuantificar la presencia en solución acuosa del ácido tereftálico y tres de sus principales subproductos de fabricación (ácido benzoico, ácido p-toluico y ácido 4-carboxibenzaldehído).

Tercer trimestre:

Se repitió la prueba de biodegradación. Se cambiaron las concentraciones a 110, 250 y 380 mg/L, también se determinó la producción de metano, así como la generación de subproductos.

PRUEBAS

DE

BIODEGRADACION

INTRODUCCION

La metanogénesis es un proceso que se puede presentar en diversos ambientes anóxicos, Este asociado a la descomposición de la materia orgánica en ecosistemas tales como sedimentos marinos, rumen, tracto intestinal de animales y lodos de digestores anaerobios utilizados en el tratamiento de aguas negras. Los substratos más importantes para las bacterias metanogénicas son el acetato, CO_2 e H_2 ; pero estas bacterias necesitan estar en asociación sintrófica con bacterias fermentadoras para poder degradar compuestos orgánicos complejos a substratos utilizables, esta asociación es obligatoria.

Las primeras investigaciones realizadas por Tarvin y Buswell en 1934 demostraron que un consorcio metanogénico presente en lodos anóxicos podía degradar compuestos aromáticos bencénicos hacia CO_2 y CH_4 . Investigaciones posteriores demostraron que los intermediarios de la degradación del benzoato bajo condiciones metanogénicas eran acetato, propionato y butirato, además de CO_2 e H_2 (Fina *et al.*, 1978; Kaiser y Hanselman, 1982; Shlomi *et al.*, 1978).

Las vías de biodegradación de varios compuestos aromáticos, entre ellos el benzoato están bien estudiadas y para algunos de ellos se conocen hasta las rutas posibles de biodegradación: catecol y fenol (Healy and Young, 1988); catecol, fenilacetato y fenilpropionato (Balva and Evans, 1980) y compuestos aromáticos derivados de la lignina (Kaiser and Haselmann, 1982).

En los últimos años varios grupos de investigadores han estudiado extensivamente la degradación de compuestos aromáticos, por lo que muchos de ellos han sido reportados como biodegradables bajo condiciones anaerobicas (metabolismo fotosintético, respiración por nitrato y fermentación metanogénica).

Las sustancias aromáticas naturales tienen un papel muy importante en los organismos. Su biosíntesis y degradación forman una parte importante del ciclo del carbono (Evans, 1988).

El gran desarrollo de la agricultura e industria durante la segunda mitad de este siglo, trajo como uno de sus resultados la producción de compuestos químicos sintéticos (xenobióticos) que causan un efecto negativo sobre el ambiente. Considerados tóxicos, afectan a los demás seres vivos. Los xenobióticos son compuestos con estructura química con la cual los microorganismos no han tenido contacto en el curso de la evolución (Leisinger y Brunner, 1986), por lo que existe dificultad en su biodegradación. Esta resulta mucho más complicada que en el caso de otros compuestos debido al carácter recalcitrante de la mayoría de los xenobióticos (Kennes y col., 1993). Este carácter recalcitrante o la dificultad de biodegradar estos compuestos puede ser debida a varios factores como por ejemplo: disponibilidad, falta de nutrientes para determinar su destino, falta de un co-metabolito, condiciones ambientales inadecuadas (pH, O₂, rédox y temperatura), ausencia del microorganismo apropiado, etc. Para la comprensión de estos fenómenos surge la necesidad de realizar pruebas con varias fuentes de inóculo, para determinar el grado de biodegradación del compuesto en anaerobiosis. Lo anterior permitiría posteriormente el desarrollo de un proceso adecuado para tratar efluentes que contengan estos compuestos.

ANTECEDENTES

Debido a la gran importancia del tratamiento anaerobio del ácido tereftálico, se han logrado establecer programas de investigación en

colaboración entre el Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación (ORSTOM), el Instituto de Ingeniería de la UNAM y la UAM - Iztapalapa. Además se logró el contacto con el sector industrial, específicamente con PEMEX y Tereftalatos Mexicanos.

El ácido tereftálico (ácido 1-4 bencenodicarboxílico) como polietileno tereftalato es usado para la fabricación de fibras textiles de poliéster, películas de poliéster (rayos x, microfilms, cintas de audio y video), botellas de plástico y adhesivos. Sus propiedades físicas se presentan en la tabla 1.

El tratamiento anaerobio de efluentes de la industria petroquímica que produce ácido tereftálico ha sido probado utilizando reactores UASB, aunque no parece ser el más apropiado para este tipo de efluente, ya que se obtienen eficiencias de remoción de la DQO entre un 44 y 46 % (Guyot *et al.*, 1990). En cambio al utilizar un reactor de película fija de circulación descendente, se pudo obtener eficiencias de remoción hasta del 75%, siempre y cuando el agua de desecho cruda sea decantada y neutralizada antes de la alimentación del reactor (Noyola *et al.*, 1990).

JUSTIFICACION

En la actualidad existe la necesidad de crear estrategias para el tratamiento de efluentes industriales que contienen compuestos aromáticos, estos son frecuentemente tóxicos o dañinos para la salud. El tratamiento anaerobio es una vía alternativa, en la cual, se espera que los inóculos anaerobios se adapten a algunos compuestos tóxicos, para finalmente degradarlos. Los resultados que se deriven de estos estudios, pueden ser

aplicados a niveles industriales para solucionar algunos problemas ambientales generados por las industrias del sector petroquímico.

* Nombre común	Acido Tereftálico
* Nombre IUPAC	Acido Benceno-1,4 dicarboxílico
* Fórmula	$C_8H_6O_4$
* P. M.	166.14
* P. F.	404 °C
* P. E.	-----
* Solubilidad g/100 mL solvente	
Agua	0.0019 (25°C); <0.04 (100°C) Sal de sodio: 14 (25°C)
Metanol	0.1 (25°C)
Acido Acético	0.035 (25°C)
* Densidad	1.51 (25°C)
* Principales subproductos de fabricación:	- Acido p-tolúico - Acido tereftalaldehídico (ácido 4-carboxibenzaldehído) - Acido benzoico

Macarie, H., 1992)

Tabla 1. Características físicas del ácido tereftálico.

METODOLOGIA

En la primer prueba de biodegradación se utilizaron lodos frescos procedentes de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de la UAM-I. Los lodos fueron lavados con agua reducida y puestos a vacío 12 horas antes de comenzar la cinética. Los lodos fueron diluidos al 20% con medio mineral Balch para bacterias metanogénicas acetoclásticas (Balch *et al.*, 1979).

Se realizaron 3 tratamientos en botellas serológicas de 57.37 mL (control estéril, control y problema) por triplicado, probando dos concentraciones del compuesto aromático (20 y 60 mg/L). Se determinó la producción de metano por cromatografía de gases durante un periodo de 82 días, tomando lectura 3 veces por semana.

Todas las pruebas se realizaron bajo condiciones de anaerobiosis estricta, en ausencia de luz, bajo agitación constante y a una temperatura de 34°C.

La segunda prueba de biodegradación tuvo algunas modificaciones con respecto a la primera (tablas 2 y 3).

CONTROL ESTERIL	CONTROL	PROBLEMA
Medio Balch (16 mL)	Medio Balch (16 mL)	Medio Balch (16 mL)
Lodos (4 mL)	Lodos (4 mL)	Lodos (4 mL)
Na ₂ S (0.4 mL)	Na ₂ S (0.4 mL)	Na ₂ S (0.4 mL)
Tereftálico (0.4 mL)		Tereftálico (0.4 mL)

Tabla 2. Prueba de biodegradabilidad con 20 y 60 mg/L de ácido tereftálico.

CONTROL ESTERIL	CONTROL	PROBLEMA
Medio Balch (50 mL)	Medio Balch (50 mL)	Medio Balch (50 mL)
Lodos (12 mL)	Lodos (12 mL)	Lodos (12 mL)
Na ₂ S (0.6 mL)	Na ₂ S (0.6 mL)	Na ₂ S (0.6 mL)
Tereftálico (0.4 mL)		Tereftálico (0.4 mL)

Tabla 3. Prueba de biodegradabilidad con 110, 250 y 380 mg/L de ácido tereftálico.

222411

Los lodos utilizados fueron del mismo origen, pero durante los 6 meses anteriores se alimentaron con 1 g/L de glucosa y acetato de sodio (1:1).

Al momento de preparar el medio mineral Balch no se adicionó el extracto de levadura ni la peptona.

Las pruebas se realizaron en botellas serológicas de 116 mL, esto para poder tomar 1 mL de muestra y analizarla por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las concentraciones de ácido tereftálico a probar fueron 110, 250 y 380 mg/L.

RESULTADOS Y DISCUSION.

La biodegradación del ácido tereftálico (AT) en condiciones aerobias ha sido estudiada ampliamente entre otros por Karegoudar *et al.*, en 1985 y por Sivamurthy *et al.*, en 1989. Ellos identificaron a una bacteria gram positiva con habilidad para utilizar al AT como única fuente de carbono e identificaron al protocatecuato como un intermediario importante de tal biodegradación.

En la biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos se ha estudiado al benzoato como modelo, ya que las investigaciones de biodegradación sobre una gran parte de ellos aparece como sustrato (tabla 4).

Para determinar la biodegradación del AT se utilizó la técnica de las botellas serológicas, la cual es fácil de realizar y además es la que es usada más ampliamente. Esta técnica ha sufrido algunas modificaciones desde su primera utilización, pero ha probado ser muy efectiva (Grady, 1985).

Los resultados de la primera prueba de biodegradación son mostrados en las gráficas 1 y 2. En la primera, la cual corresponde a una concentración de 20 mg/L de AT se observa claramente que no hay biodegradación, ya que el comportamiento del control y problema son prácticamente el mismo, además de que las desviaciones estándar en cada punto se sobreponen, lo cual indica que no hay diferencia significativa entre el control y problema. Por otra parte, en la segunda gráfica que corresponde a una concentración de 60 mg/L de AT, se observa que sí existe una diferencia significativa, por lo que la producción de metano es debida a la biodegradación del AT. Se determinó que el % de biodegradación era de 69.5 (tabla 5). Aunque no se puede considerar como mineralización completa, sí está dentro del rango de biodegradación parcial según determinaron Battersby y Wilson en 1989, ya que la producción neta de metano es mayor al 30% pero menor a 80%, por lo que es considerado como persistente.

Para confirmar que la producción de metano observada era debida a una disminución del AT, se procedió a realizar la segunda prueba de biodegradación, utilizando la técnica de HPLC, primeramente para establecer si tal producción de metano estaba relacionada con una disminución en la concentración del AT; y segundo, para determinar la presencia de intermediarios como pudiera ser el benzoato.

VÍA	ORGANISMO	SUSTRATO	REFERENCIA
Foto metabolismo anaerobio	<i>Rhodopseudomona palustris.</i>	Benzoato	(Proctor and Scher, 1960)
Respiración nitrato	<i>Pseudomonas NP-1</i> <i>Bacillus sp.</i>	Benzoato o-Phtalato	(Oshima, 1965) (Afring, 1981) (Afring <i>et al.</i> , 1981)
Sulfato reducción	<i>Desulfovibrio sp.</i>	Benzoato ⁻	(Widdel, 1980)
Fermentación	<i>Eubacterium oxidoreducens.</i>	Polifenoles	(Krumholz and Bryant, 1986)
Fermentación metanogénica	Consortio microbiano.	Benzoato	(Fina <i>et al.</i> , 1976)

Tabla 4. Metabolismo anaerobio de compuestos aromáticos (Evans, 1988).

En la segunda prueba de biodegradación se utilizaron diferentes concentraciones de AT con respecto a las de la primera prueba. Además, al momento de preparar el medio mineral Balch no se adicionó el extracto de levadura ni la peptona, ya que estudios realizados en este laboratorio indicaron que su presencia influía considerablemente en la producción de metano, por lo que se decidió eliminarlos del medio. Los resultados mostraron que no hay biodegradación a 110 mg/L, 230 mg/L ni a 380 mg/L (gráficas 3, 4, y 5; y tabla 5). Los resultados del consumo del AT que son mostrados en la gráfica 6, indican contundentemente que no hay disminución de la concentración del AT

durante el tiempo que dura la cinética, por lo que bajo estas condiciones no hay biodegradación.

Ácido tereftálico (mg/L)	Metano teórico ($\mu\text{mol/mL}$)	Metano Exp. ($\mu\text{mol/mL}$) (*)	% de Biodegradación.	Conc. inicial (mg/L)	Conc. final (mg/L)
20	0.42	0	0	*ND	*ND
60	1.28	0.89	69.5	*ND	*ND
110	2.35	0	0	110	116
250	5.33	0	0	250	254
380	8.10	0	0	380	385

Tabla 5. Balance de la producción de metano y cuantificación del ácido tereftálico por HPLC.

% Biodegradación > 80 → Mineralización completa

% Biodegradación < 30 → Persistente

% Biodegradación < 0 → Inhibición

*ND = No determinado

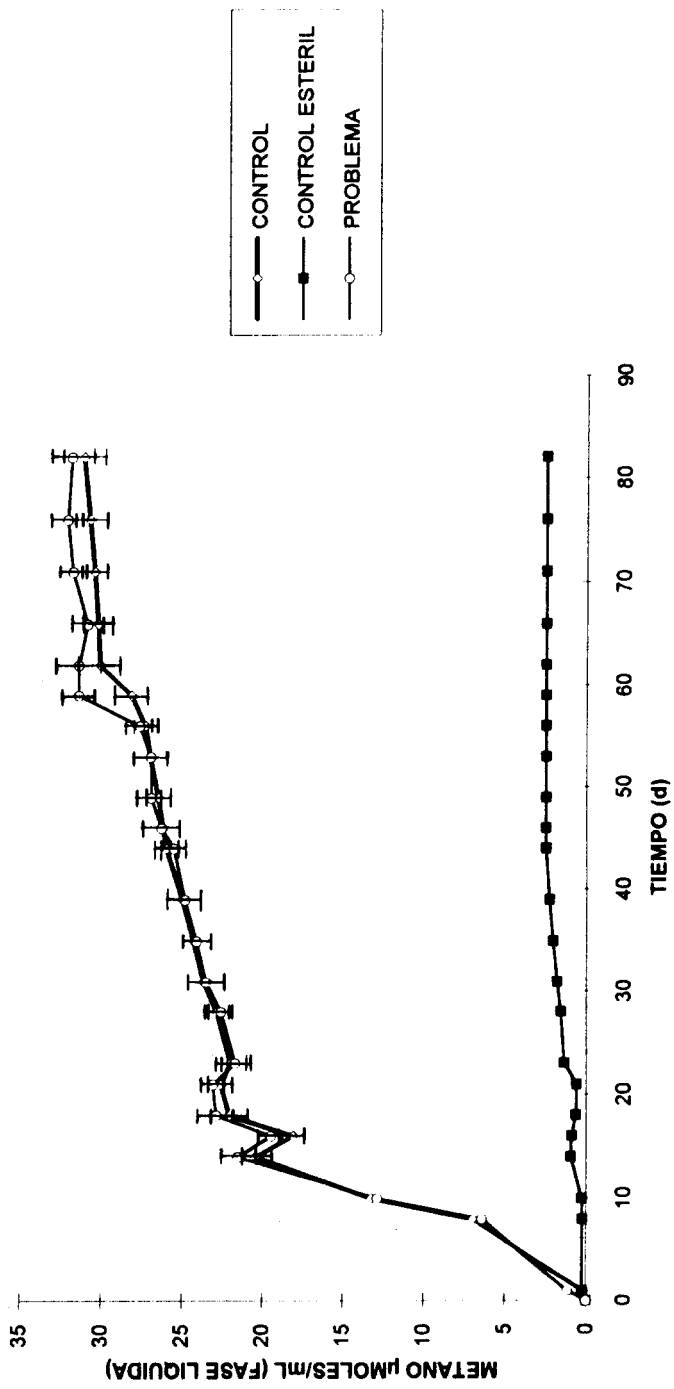
(Battersby and Wilson, 1989).

(*) Esto corresponde a la diferencia de CH_4 producido entre el testigo y las botellas con ácido tereftálico.

Se realizó el análisis de medias correspondiente con un nivel de significancia de 0.05 para cada tratamiento, en las dos pruebas de biodegradación. Hubó únicamente diferencia significativa con 60 mg/L de ácido tereftálico, por lo que se confirma que a esta concentración si hay biodegradación.

Con respecto al control estéril que se analizó en las pruebas de biodegradación, su fin era demostrar que el ácido tereftálico no sufría remoción no biológica, es decir, que no existieron factores físicos que provocaran una disminución de su concentración. En la primera prueba de biodegradación no hay una producción significativa de metano, pero en la segunda prueba, después de 20 días, hay una producción importante de metano. Se pudo confirmar mediante el análisis en HPLC que la concentración de ácido tereftálico no cambiaba a lo largo de la cinética, y que el metano producido que se observa en las gráficas 3 y 4, puede ser debido más que nada a una recuperación de la población bacteriana después de 20 días, esto puede explicarse debido a que durante la esterilización ocurre un rompimiento total de los gránulos y son liberados carbohidratos y proteínas contenidos en las envolturas celulares (Dolfing, *et al.*, 1985).

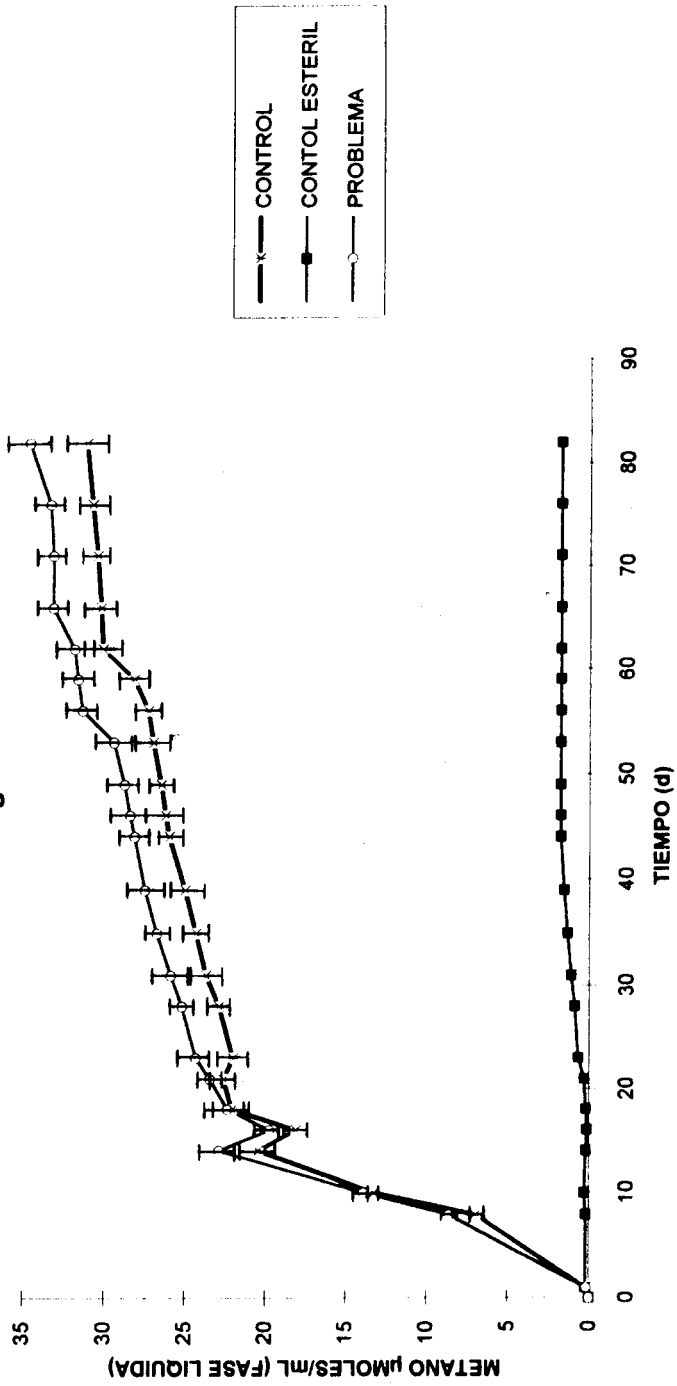
**GRAFICA 1. BIODEGRADACION DEL ACIDO TEREF TALICO
20 mg/L**



NOTA: Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

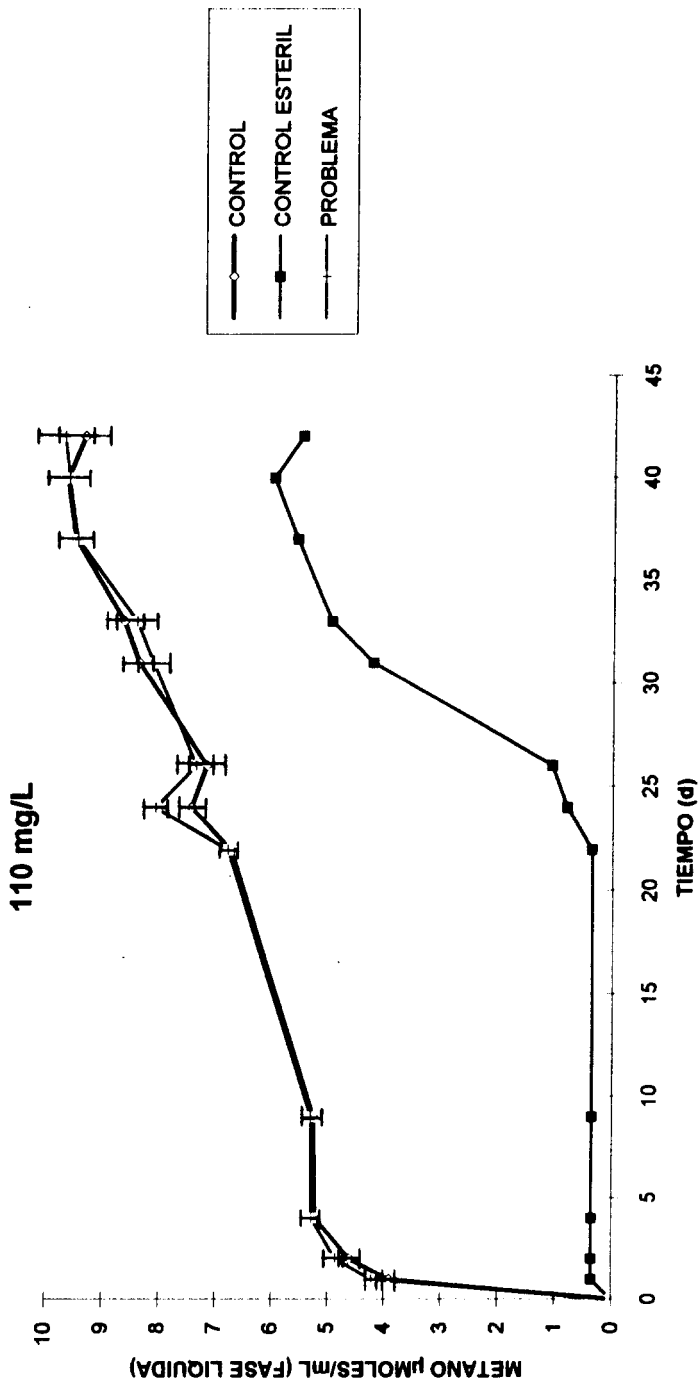
GRAFICA 2. BIODEGRADACION DEL ACIDO TEREFTALICO

60 mg/L



NOTA: Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

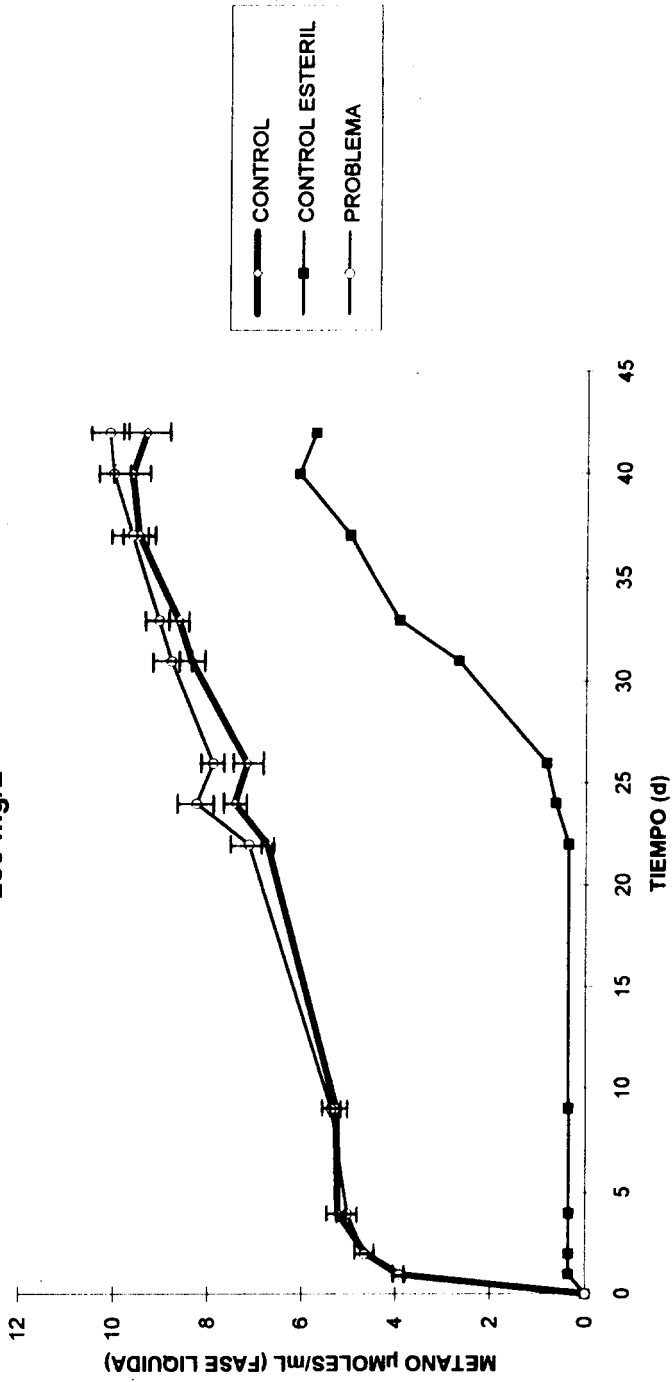
GRAFICA 3. BIODEGRADACION DEL ACIDO TEREFTALICO



NOTA: Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

GRAFICA 4. BIODEGRADACION DEL ACIDO TEREF TALICO

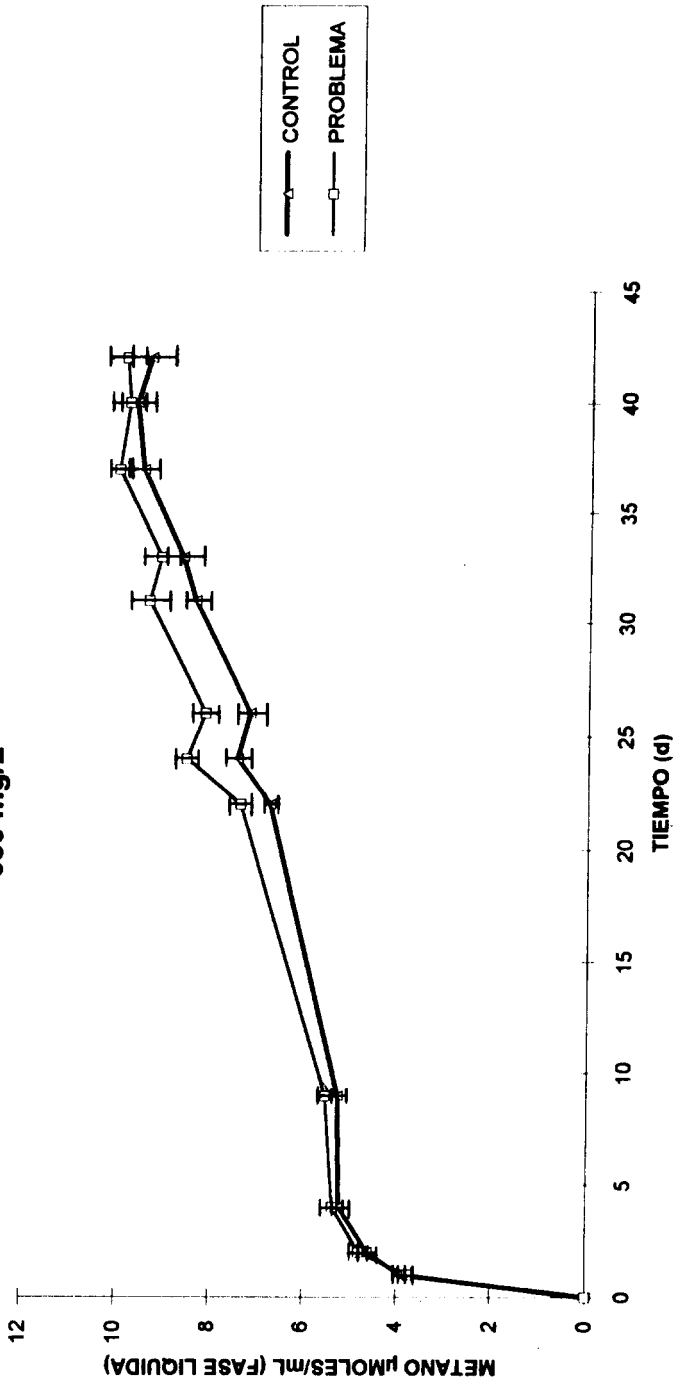
230 mg/L



NOTA: Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

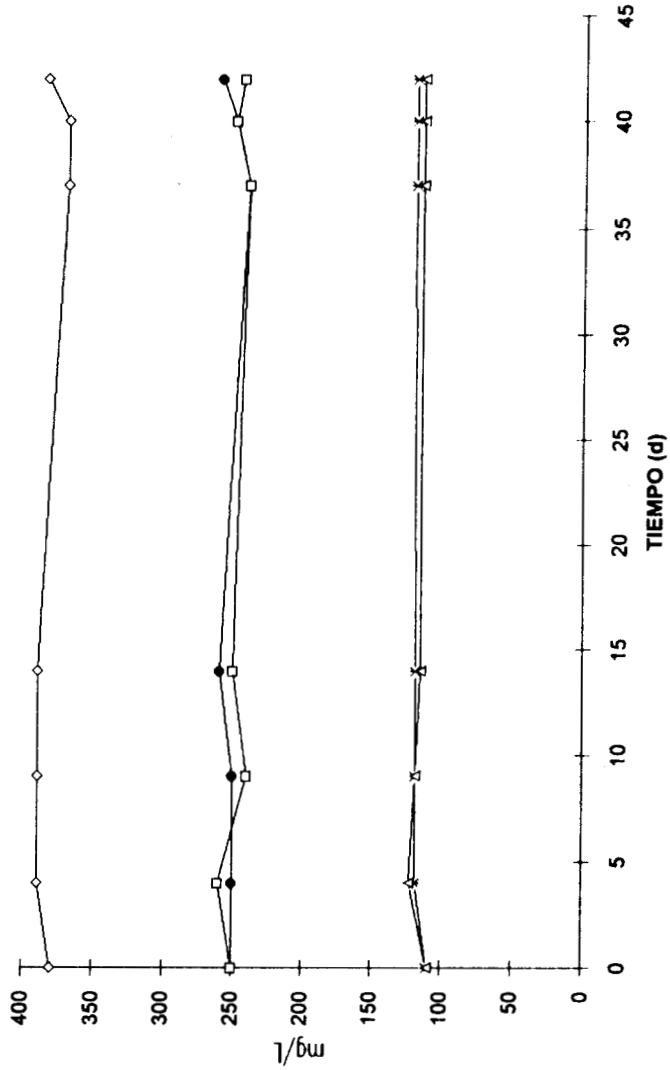
GRAFICA 5. BIODEGRADACION DEL ACIDO TEREFTALICO

380 mg/L



NOTA: Las barras de error representan la desviación estándar de cada punto.

CONSUMO DE ACIDO TEREF TALICO



C.E. = CONTROL ESTERIL
P. = PROBLEMA

GRAFICA 6.

REFERENCIAS

Afring P., and Taylor F. 1981. *Aerobic and anaerobic catabolism of phthalic acid by a nitrate-respiring bacterium*. Arch. Microbiol. **130**:101-104.

Balch, W. E. et al., 1979. *Methanogens: Reevaluation of a unique biological group*. Microbiol. Rev. **43**:260-269.

Balba, M. T. and Evans, W. C. 1980. *The methanogenic biodegradation of catechol by a microbial consortium: Evidence for the production of phenol through cis-benzenediol*. Biochem. Soc. Trans. **8**:452-453

Battersby, N. S., and Wilson, V. 1989. *Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge*. Appl. Environ. Microbiol. **55**:433-439.

Dolfing, J., Griffioen, A., Van Neerven A. R. W. and Zevenhuizen L. P. T. M. 1985. *Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge*. Can. J. Microbiol. **31**: 744-750.

Evans, W. C. 1977. *Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments*. Nature **270**:17-22

Evans, W. C. 1988. *Anaerobic degradation of aromatic compounds*. Ann. Rev. Microbiol. **42**:289-213.

Fina. L. R., Bridges, R. L., Coblenz T. H. and Roberts, F. F. 1978. *The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. III. The fate of carbon four and the identification of propionic acid*. Arch. Microbiol. **118**:169-172.

Grady, L. 1985. *Biodegradation: Its measurement and microbiological basis*. Biotechnology and Bioengineering **27**:660-664.

Guyot, J. P., Macarie, H., and Noyola, A. 1990. *Anaerobic digestion of a petrochemical wastewater using the UASB process*. Appl. Biochem. Biotechnol. **24**:579-589.

Healy, J. B. and Young L. Y. 1978. *Catechol and phenol degradation by a methanogenic population of bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. **35**:216-218.

Kaiser, J. P. and Hanselman K. W. 1982a. *Aromatic chemicals through anaerobic microbial conversion of lignin monomers*. Experientia **38**:167-176.

Karegoudar T. B. and Pujar B. G. 1985. *Degradation of terephthalic acid by a Bacillus species*. FEMS Microbiol. Lett. **30**:217-220.

Kennes, C., Lema, M., y Veiga, C. 1993. *Biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos. Resumen del módulo "Tecnología de tratamiento de aguas" del Master en Ciencia, Tecnología y gestión ambiental, celebrado en la Universidad de Santiago de Compostela entre el 25 de Enero y el 26 de Marzo de 1993, España*.

Leisenger, T. and Brunner, W. 1986. *Biotechnology (Microbial degradation)*. Edit by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 8, VCH, Federal Republic of Germany.

Leslie Grady, C. P. 1985. *Biodegradation: Its measurement and microbiological basis*. Biotechnol. Bioeng., **27**:660-674.

Macarie, H. 1992. *Traitement anaérobie des effluents d'une usine pétrochimique produisant un composé aromatique, l'acide téréphtalique (acide benzéne-1,4 dicarboxilique)*. Thèse pour obtenir la grade de Docteur-Mention Sciences. Page 11. Université de Provence Aix-Marseille I, France.

Noyola, A., Macarie, H. and Guyot, J. P. 1990. *Treatment of terephthalic acid plant wastewater with an anaerobic fixed film reactor*. Environ. Technol. **11**:239-248.

Shlomi, E.R., Lankhorst A., and Prins R.A. 1978. *Methanogenic fermentation of benzoate in an enrichment culture*. Microb. Ecol. 4:249-261.

Sivamurthy K. and Pujar B. G. 1989. Bacterial degradation of dimethylterephthalate. J. Ferment. Bioeng., (5) 68:375-377.

TÉCNICA DE
HPLC, PARA
EL ESTUDIO
DE LA
BIODEGRADACION

INTRODUCCION

Por definición, la cromatografía líquida (CL) incluye a todas las técnicas cromatográficas en las cuales la fase móvil es un líquido. Así es que la cromatografía en capa fina, exclusión molecular, intercambio iónico y de alta presión, por nombrar algunas, todas ellas pertenecen a esta clase, independientemente de la naturaleza de la fase estacionaria o del equipo usado (Heftmann, 1992).

La CL puede ser aplicada a una gran variedad de muestras que por algunas otras técnicas de separación sería muy complicado analizar. Está basada sobre el fenómeno que, bajo las mismas condiciones, cada componente en una mezcla interactúa ordinariamente con este ambiente de una manera diferencial a todos los demás compuestos.

La separación es requerida cuando (1) una mezcla es tan compleja para una medición analítica directa, como por ejemplo, por espectroscopía, (2) los materiales a ser analizados son muy similares, (3) es necesario preparar materiales altamente puros, y (4) cuando la medición de la cantidad de un material es necesitado (Bidlingmeyer, 1992).

La CL moderna es una técnica para realizar separaciones precisas de mezclas complejas y ofrece capacidad de separación de alta resolución para solucionar más rápido y mejor los problemas. *High Performance Liquid Chromatography*, cuyas siglas, HPLC, designan universalmente a esta técnica.

Sin embargo, HPLC no es un instrumento analítico típico en el cual se coloque la muestra en el instrumento directamente y comience el análisis y nos de una señal (análoga o digital) la cual represente la cantidad presente. Sino que se requiere de mucho tiempo para preparar y estabilizar el instrumento para realizar cada análisis, con la mayor precisión posible. Esto puede ser horas o

días dependiendo del problema (aplicación), el conocimiento del operador, y del tipo de experimentación a realizar.

La muestra a ser analizada es disuelta en un solvente adecuado, introducida (inyectada) hacia la columna y acarreada a través de la columna por un flujo continuo de un mismo solvente (fase móvil), en el cual la muestra fue disuelta. La separación toma lugar en esta columna, la cual tiene partículas con una gran área de superficie. Estas partículas son referidas como (fase estacionaria). El dispositivo o componente para la aplicación del volumen exacto de muestra hacia la columna es el inyector.

Los componentes de la muestra que son inyectados interactúan reversiblemente con la fase estacionaria en una forma continua. La fase móvil (llamada eluyente) es transportada a través del soporte de la columna usando un sistema repartidor de solvente denominado bomba. Con la selección de la fase móvil apropiada y el material de empacado correcto, algunos componentes de la mezcla podrán viajar a través de la columna más lentamente que otros.

La salida de los componentes de la columna son puestos de manifiesto por el detector, el cual manda la señal al monitor o a la impresora para visualizar el cromatograma. Este indica la presencia de los componentes y es una representación de la respuesta del detector como una función del tiempo. Entre otras cosas, nos puede indicar el número de compuestos presentes, el tiempo de retención preciso para cada componente, tipo de compuesto presente, la concentración de cada componente y la pureza de las fracciones separadas, todas las decisiones que son hechas después del uso de la técnica de HPLC son basadas sobre el cromatograma (Heftmann, 1992).

La contribución de la técnica de HPLC a investigaciones ambientales que se han realizado específicamente en calidad del agua son principalmente investigaciones de monitoreo del agua para determinar donde ocurre la

contaminación y poder seguir la subsecuente reducción del nivel de esta. Otra área de interés en la contaminación del agua, es la detección de pesticidas en ríos, lagos, lagunas, etc., HPLC es un método muy efectivo, para la separación y análisis de una gran variedad de ellos.

Quizá la área más atendida por esta técnica, es la detección de compuestos aromáticos originados por el gran desarrollo que ha tenido la industria petroquímica en las últimas décadas, siendo esta una herramienta muy poderosa para separar tales compuestos (Ostvold, 1983).

FUNDAMENTO

El mecanismo de retención en HPLC de adsorción, obedece a una adsorción por parte del relleno y fase móvil hacia el soluto (Snyder, 1974). Después al llegar el solvente o eluyente o fase móvil, puede atraer hacia el soluto, vencer esas primeras fuerzas de adsorción y arrastrarlo consigo a lo largo de la columna. Este mecanismo ocurre de forma reversible.

En HPLC de adsorción se puede operar de dos modos, en fase normal, cuando la fase móvil es líquido o conjunto de líquidos miscibles de baja polaridad (benceno, ciclohexano, tetracloruro de carbono, etc.) y por lo tanto la fase estacionaria es de naturaleza contraria, es decir, polar; y en fase reversa, cuando la fase móvil es un líquido o líquidos polares (agua, acetonitrilo, metanol etc.) y la fase estacionaria es de naturaleza apolar (Howard y Martin, 1950).

Si se opera en fase reversa, los grupos polares de las moléculas a separar, tienen muy poca tendencia hacia la fase estacionaria y mucho más hacia la fase móvil, por lo que su retención es escasa y sus valores de k' ; al

contrario los grupos apolares de las moléculas son muy atraídos y absorbidos por la superficie del soporte.

La HPLC de adsorción resulta eficaz para resolver mezclas de compuestos con diversos grupos funcionales, por lo que es el mejor tipo para intentar resolver mezclas isoméricas (Colin *et al.*, 1978).

MATERIALES Y MÉTODOS.

EQUIPO

Se utilizó el sistema de cromatografía de líquidos de alta presión modelo GS3540, marca LDC analytical, formado por: bomba modelo constaMetric 3500 (controladora del gradiente), bomba constaMetric 3200 (controladora del flujo), detector programable UV/VIS spectroMonitor 4100, válvula de inyección Rheodyne 7125, des gasificador de membrana, software LCtalk en ambiente windows para control de bombas y detector, y computadora American Megatrend 486DX con monitor VGA. Se utilizó una columna μ Bondapak TM C18 10 μ M (300*4.5 mm D.I.) No. 027324.

REACTIVOS

Los solventes utilizados fueron: agua marca Mallinckrodt Chrom AR, metanol marca OmniSolv y ácido acético marca Chromanorm, todos ellos grado HPLC. Los compuestos aromáticos probados fueron: ácido tereftálico, sal disódica 96% de pureza, p.m. 210.1 marca Aldrich; 4-carboxibenzaldehído 97% de pureza, p.m. 150.13 marca Aldrich; ácido benzoico, sal de sodio, p.m. 144.1 marca Sigma; ácido p-toluico 98% de pureza, p.m. 136.2 marca Sigma y reactivo A PIC (fosfato de tetrabutíl amonio) marca waters.

PROCEDIMIENTO GENERAL.

(a) Preparar las soluciones estándares de los ácidos tereftálico, 4-carboxibenzaldehído, benzoico y p-toluico , A una concentración no mayor a 1 g/L.

(b) Filtrar los solventes orgánicos en membranas Cole-Parmer de 0.45 μm de nylon, con el objetivo de evitar ruptura en el filtro y por lo tanto pérdida del solvente.

Los solventes utilizados para analizar a los ácidos tereftálico, 4-carboxibenzaldehído y benzoico son:

Recipiente A, agua con 5% de ácido acético, ajustado a pH de 3.5 con NaOH 5N; Recipiente B, metanol con 5% de ácido acético, también a pH de 3.5, en una proporción de (90:10), (A:B).

El solvente utilizado para el ácido p-toluico es:

Mezcla de agua y metanol (50:50) más reactivo A PIC (1 botella/L de solvente). La botella contiene aproximadamente 14 mL.

NOTA: Para el ácido p-toluico, los conductos de alimentación de solventes (A y B) deben de estar en la misma botella.

(C) El encendido del equipo de preferencia realizarlo de la siguiente forma:

1.- Encender la bomba degasificadora (Membrane Degasser), ponerla en "Run" y cambiar inmediatamente a "Auto".

2.- Encender las bombas de distribución de solventes (constaMetric 3200 y 3500). Si en la bomba 3200 se prende el foco rojo, oprimir el botón de "reset" para estabilizarla. La bomba 3500 realiza una auto verificación, hay que observar que no exista ningún problema de funcionamiento.

222411

3.- Encender el detector (spectroMonitor), también, estar al pendiente de la auto verificación hasta que aparezca "Ready".

4.- Por último encender la computadora y activar el icono LCTalk, cuando aparezca el mensaje "Data file exist, "OVERWRITE"?. Seleccionar aceptar.

Si aparece "Serial pump not responding", apagar todo y reintentar de nuevo.

(D) Purgar las bombas con la jeringa de 50 mL, sacando 20 mL aproximadamente de cada una de ellas.

(E) En el menú principal seleccionar "File", "Load", y escoger el archivo que contenga toda la información bajo la cual se analizará la muestra, o en su defecto, seleccionar "Edit", "Edit", "File" y "New", para editar un nuevo archivo para crear: el método (method), secuencia (sequence) y el reporte (report). Estos tres archivos son indispensables para el desarrollo del análisis, están íntimamente comunicados, por lo que hay que tener un especial cuidado en su creación.

(F) A continuación un ejemplo de como correr una muestra.

Aromático	Solvente A	Solvente B	PIC A	pH	Archivo
Tereftálico	Agua + acético 5%	Metanol + acético 5%		Ajustar a 3.5	terefta
4-CBA	"	"		"	carboxi
Benzoico	"	"		"	benzoico
p-Toluico	Agua	Metanol	1 botella/L	7.8	toluic

Características de los solventes utilizados y nombres de los archivos correspondientes.

I. Inyectar hasta que la línea basal este estable. Para ver línea basal activar "Options", "Display on" y activar "Baseline".

NOTA: Inyectar con la línea basal desactivada. (dar doble clic)

II. Inyectar con la válvula de inyección en posición "Load", cambiar a "Inject" girando lentamente.

III: Activar inmediatamente "Run", "Start" del LCtalk Release menu.

IV: Al terminar de correr la muestra el cromatograma es impreso automáticamente, por lo que hay que tener en línea a la impresora.

V. Cuando termine de imprimir, activar "Run", "Abort", "Options", "Display off", si ya está en "Ready", activar "Options", "Display on", activar y desactivar rápidamente "Baseline", activar "Run" e inyectar.

Si al terminar de imprimir el cromatograma se selecciona "Run" y ya está listo para otra inyección, entonces activar y desactivar rápidamente "Baseline" para que el cromatograma anterior desaparezca y se pueda hacer otra inyección. Activar "Run", inyectar con la válvula en posición "Load", cambiar a "Inject" y girar lentamente.

Lo anterior puede parecer muy monótono, pero comprender el porque en ese orden ayudará a no repetir inyecciones y se ahorrará mucho solvente.

(G) Contenido de los archivos method, secuencia y report.

En el menú principal (LCtalk 2.02 Release) activar "Edit", "Edit", en el menú LClalk editor activar "File", "Open" y entonces crear los archivos correspondientes.

NOTA: No olvidar guardar los archivos, así como todos los cambios que se hagan posteriormente.

1.- Condiciones en "LClalk method file editor" de los archivos benzoico.mth, carboxi.mth y terefta.mth.

Runtime: benzoico 12, carboxi 8 y terefta 6.

Saple Rate: 2

Solvents: 2

Low Limit (PSI): 0

High Limit (PSI): 5000

Delay Time: 0.1

Equilibrate Time: 0.1

Flow: 2.0

Con A: 90

Con B: 10

Exp: 1

Events: 0

Wave: 254

Wave: 0

Zero: Activado

2.- Condiciones en "Sequence File Editor" para los archivos benzoico.seq, carboxi.seq y terefta.seq.

Method path: C:\lctalk\method\

Data path: C:\lctalk\data

Precision: Activado 6

Start: 1

End: 50

Vial Name: Benzoico, Benzaldehido o Tereftálico.

Inj Vial: 1

Volume: 10

Method: El correspondiente (benzoico.mth, carboxi.mth o terefta.mth)

Data File: El nombre que se quiera. Así aparecerá en el cromatograma.

3.- Condiciones de "Report Format Generator" para los archivos benzo.rpt, carbox.rpt y teref.rpt.

Absorbance: Default

Runtime: Default

Print Report: Activado

Print Chromatogram: Activado

Print Comment: Activado

En comentarios: Información en general de las características del análisis.

4.- Condiciones en "LCtalk method file editor" del archivo toluic.mth.

Runtime: 6
Sample Rate: 2
Solvents: 2
Low Limit (PSI): 0
High Limit (PSI): 5000
Delay Time: 0.1
Equilibrate Time: 0.1
Flow: 1.5
Con A: 50
Con B: 50
Exp: 1
Events: 0
Wave: 254
Wave: 0
Zero: Activado

5.- Condiciones en "Sequence File Editor" para el archivo toluico.seq

Method path: C:\ctalk\method\
Data path: C:\ctalk\data
Precision: Activado 6
Start: 1
End: 50
Vial Name: Acido p-toluico
Inj Vial: 1
Volume: 10
Method: toluico.mth
Data File: toluic

6.- Condiciones de "Report Format Generator" para el archivo toluic.rpt

Absorbance: Default

Runtime: Default

Print Report: Activado

Print Chromatogram: Activado

Print Comment: Activado

En comentarios: Información en general de las características del análisis.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para analizar muestras que contengan ácido tereftálico, ácido 4-carboxibenzaldehído y ácido benzoico se determinó que la mezcla de solventes adecuada es agua + metanol (90:10) al 5% de ácido acético y ajustado el pH a 3.5, en condiciones de temperatura ambiente. La mezcla de solventes concuerda con los utilizados por Taylor y Ribbons en 1983, en donde analizaron la descarboxilación bacteriana de ácidos o-ftálicos.

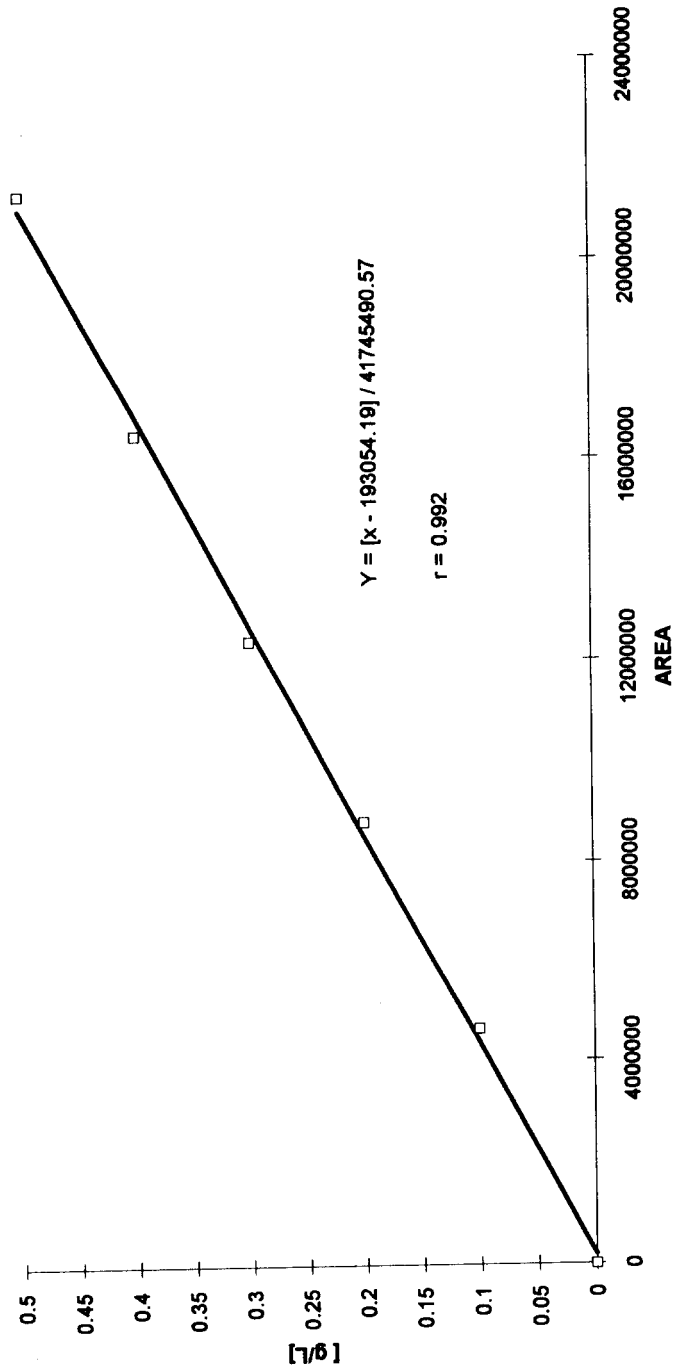
Como se puede observar, las gráficas 1 y 2, representan las curvas estándar de los ácidos tereftálico y 4-carboxibenzaldehído respectivamente, los puntos que representan las diferentes concentraciones utilizadas forman una línea recta con un coeficiente de correlación de 0.999, lo cual indica que los solventes utilizados son adecuados y que para muestras entre un rango de 0 a 0.5 g/L se pueden obtener lecturas muy confiables y reproducibles. Con respecto a la gráfica 3, del ácido benzoico, el coeficiente de correlación no es tan bueno (0.991) como los anteriores, pero fueron las mejores condiciones de

separación que se pudieron lograr para una mezcla que contenga a los tres ácidos (cromatogramas 1 al 5). Aquí es importante destacar el lavado de la columna, ya que los picos pequeños que aparecen en los cromatogramas anteriores son debidos a que, en las corridas anteriores se utilizó un solvente distinto, para eliminarlos hay que pasar 50 mL de metanol a un flujo de 1 mL/minuto y posteriormente la misma cantidad de una mezcla de metanol y agua (50:50) con el mismo flujo. Nunca se debe de dejar con agua, ya que se puede formar lama y esto puede ocasionar que se tape la columna.

Con respecto al ácido p-toluico se encontró que la mezcla de solventes adecuada para su análisis era agua + metanol (50:50) más reactivo PIC A (1 botella por litro de solvente), por comunicación directa del proveedor (cromatogramas 6 al 10). Como se puede observar en la gráfica 4, se pueden obtener lecturas muy confiables en un rango de 0 a 1 g/L, ya que su coeficiente de correlación es de 0.9998, prácticamente una recta.

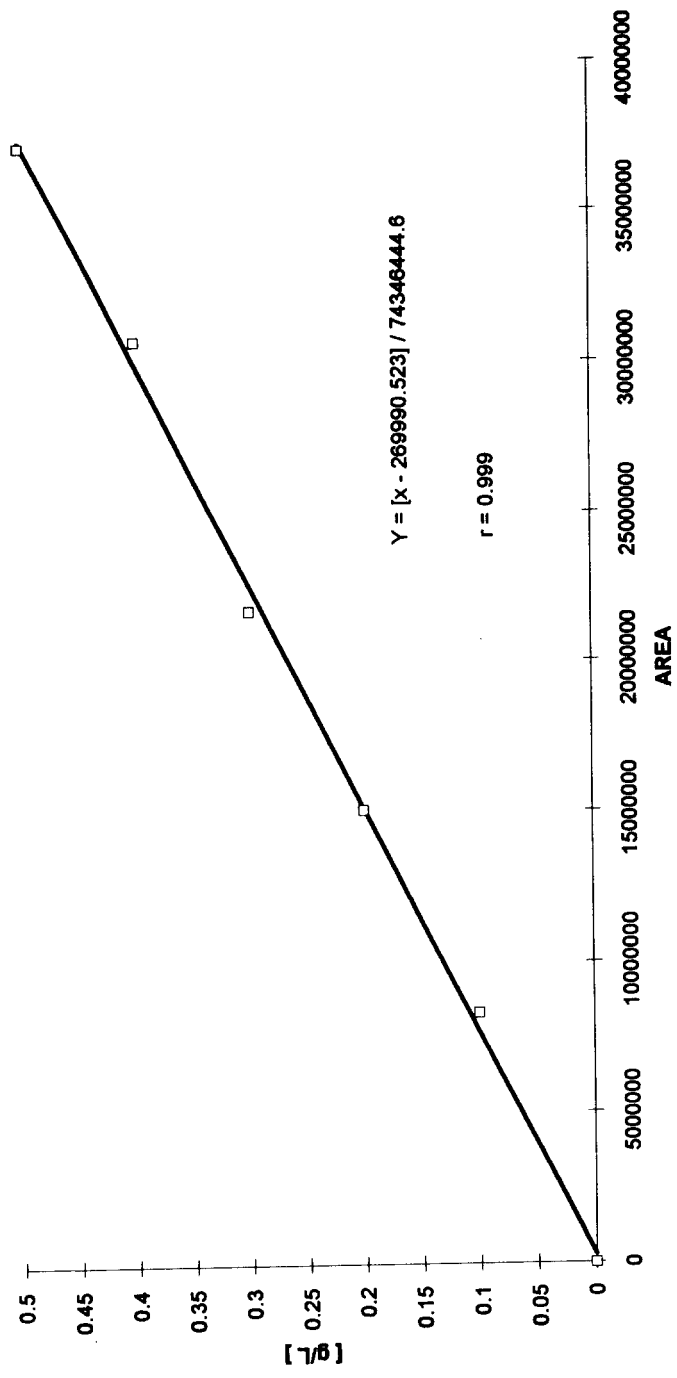
No se puede mencionar un tiempo de retención exacto para cada uno de los ácidos analizados, ya que éste puede cambiar dependiendo de la temperatura ambiente, por lo que se recomienda trabajar a una misma hora, ya que cambios de temperatura alteran el tiempo de retención y la forma del pico (Poppe and Kraak, 1983).

CURVA ESTANDAR DEL ACIDO TEREFTALICO



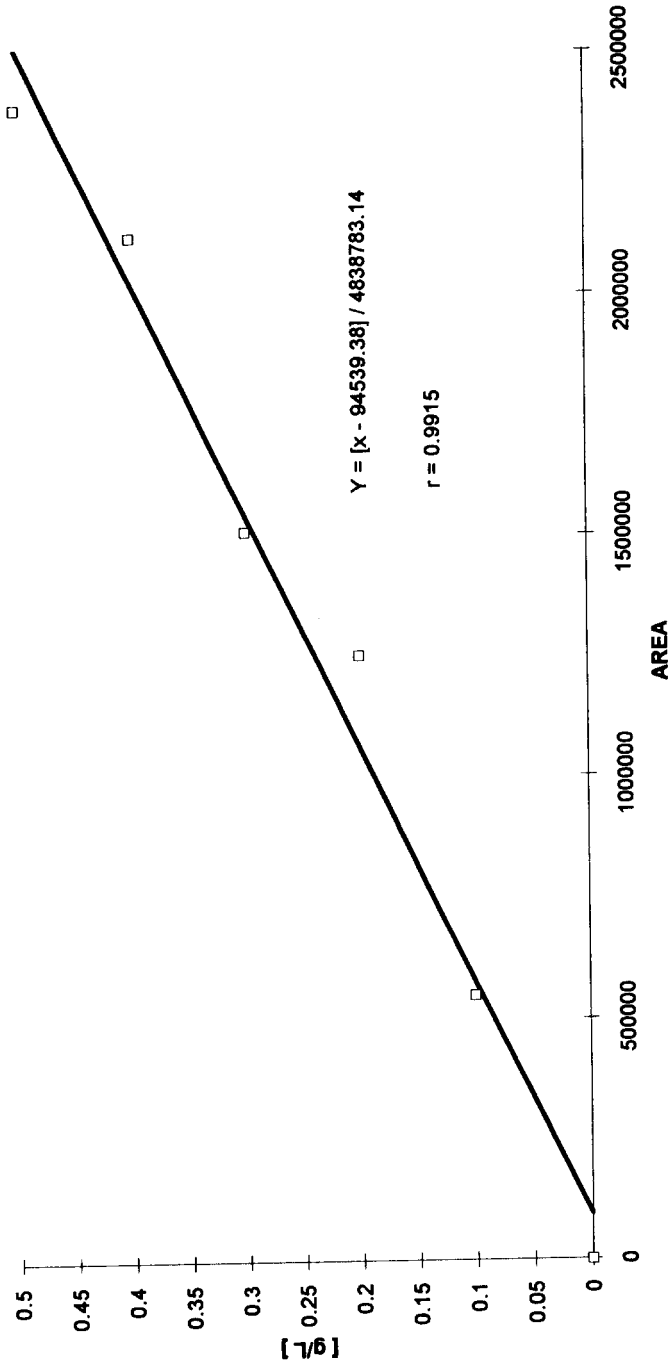
GRAFICA 1.

CURVA ESTANDAR DEL ACIDO 4-CARBOXIBENZALDEHIDO



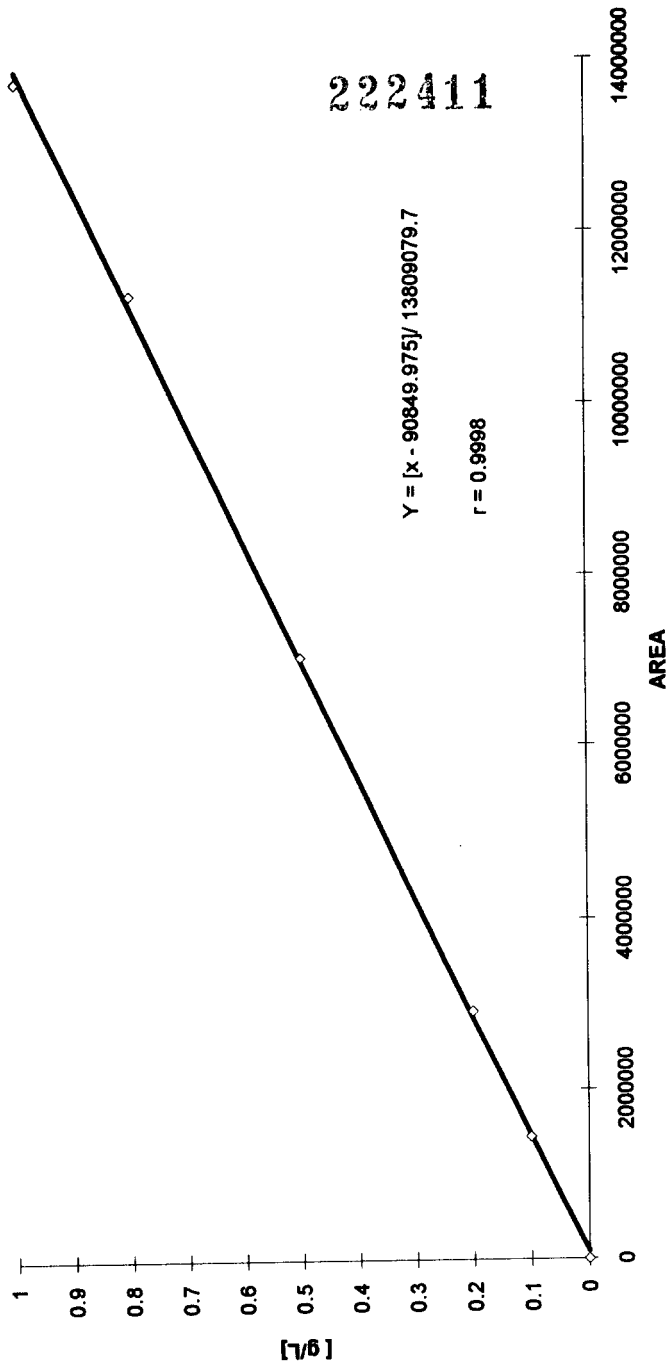
GRAFICA 2.

CURVA ESTANDAR DEL ACIDO BENZOICO



GRAFICA 3.

CURVA ESTANDAR DEL ACIDO P-TOLUICO



222411

GRAFICA 4.

Cromatograma No. 1 Muestra estandar de los ácidos (a) tereftálico, (b) 4-carboxibenzaldehído y (c) benzoico, concentración de 0.1 g/L.

c:\lctalk\data\SOLA4A.051

Vial Number 05 Vial name prueba TA, CBA

Injection Number 1 Initial Pressure 2394 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

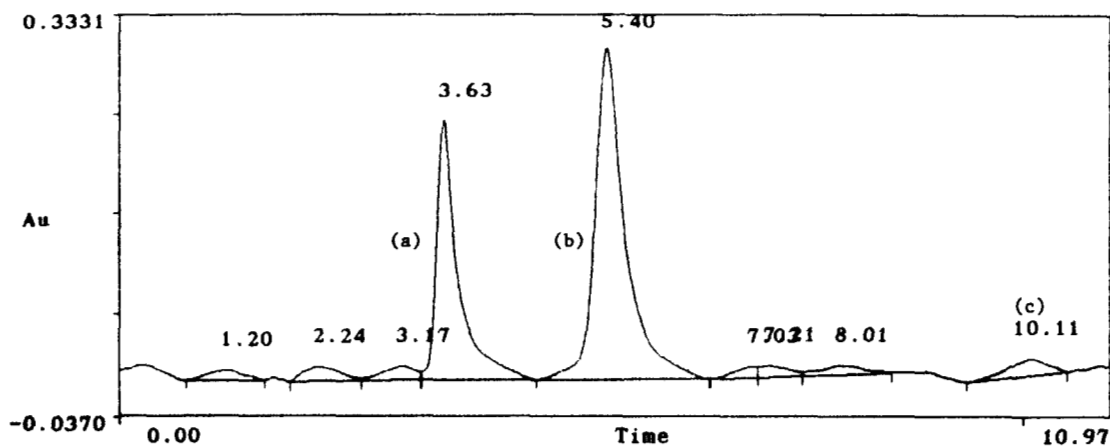
Fri Sep 15 19:49:30 1995

Fri Sep 15 19:38:27 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	2.000	90.0	10.0	1.0	254 - 0
6.00	****	****	****	****	*** - ***
12.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
1.20		287658	1.864	104391	1.404
2.24		453399	2.937	155278	2.088
3.17		362442	2.348	143887	1.935
3.63	(a)	4631581	30.006	2855831	38.400
5.40	(b)	8343129	54.052	3662158	49.242
7.03		200358	1.298	116055	1.560
7.21		270852	1.755	119525	1.607
8.01		335918	2.176	99814	1.342
10.11	(c)	549936	3.564	180113	2.422

Cromatograma No. 2 Muestra estandar de los ácidos (a) tereftálico, (b) 4-carboxibenzaldehído y (c) benzoico. concentración de 0.2 g/L.

c:\lctalk\data\SOLA4A.041

Vial Number 04 Vial name prueba TA, CBA

Injection Number 1 Initial Pressure 2428 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

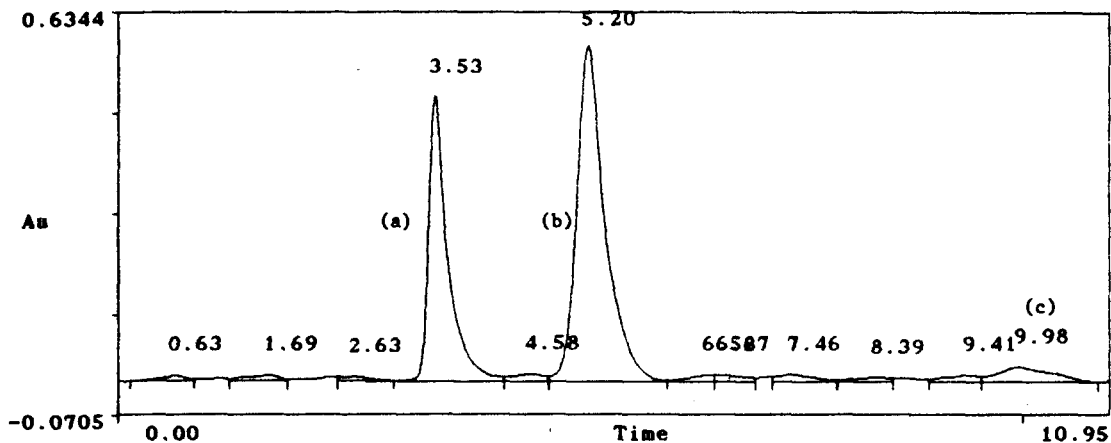
Fri Sep 15 19:37:29 1995

Fri Sep 15 19:26:26 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	2.000	90.0	10.0	1.0	254 - 0
6.00	****	****	****	****	*** - ***
12.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
0.63		217277	0.780	117178	0.811
1.69		312151	1.121	123693	0.856
2.63		212423	0.763	94139	0.652
3.53		8823632	31.696	5966926	41.302
4.58		360356	1.294	156068	1.080
5.20		15070444	54.135	7040471	48.733
6.52		251861	0.905	134177	0.929
6.67		305699	1.098	134101	0.928
7.46		419919	1.508	151091	1.046
8.39		249159	0.895	91497	0.633
9.41		360261	1.294	140085	0.970

Cromatograma No. 3 Muestra estandar de los ácidos (a) tereftálico, (b) 4-carboxibenzaldehído y (c) benzoico, concentración de 0.3 g/L.

c:\lctalk\data\SOLA4A.031

Vial Number 03 Vial name prueba TA, CBA

Injection Number 1 Initial Pressure 2430 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

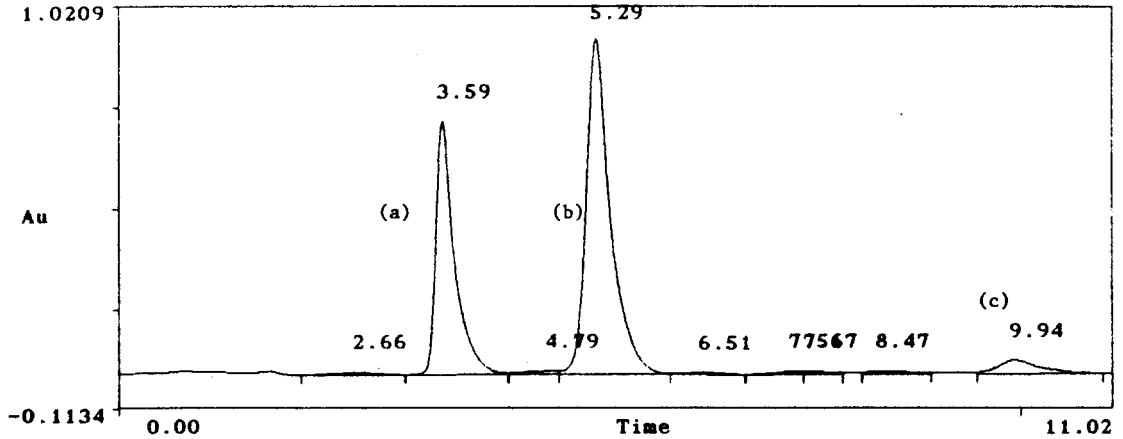
Fri Sep 15 19:24:57 1995

Fri Sep 15 19:13:50 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	2.000	90.0	10.0	1.0	254 - 0
6.00	****	****	****	****	*** - ***
12.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
2.66		336234	0.899	98386	0.468
3.59		12422838	33.207	8560450	40.757
4.79		361566	0.966	138685	0.660
5.29		21716232	58.049	11319054	53.891
6.51		204940	0.548	74384	0.354
7.51		241590	0.646	123319	0.587
7.67		239025	0.639	116985	0.557
8.47		385565	1.031	111676	0.532
9.94		1501879	4.015	460583	2.194

Cromatograma No. 4 Muestra estandar de los ácidos (a) tereftálico, (b) 4-carboxibenzaldehído y (c) benzoico, concentración de 0.4 g/L.

c:\lctalk\data\SOLA4A.021

Vial Number 02 Vial name prueba TA, CBA

Injection Number 1 Initial Pressure 2426 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

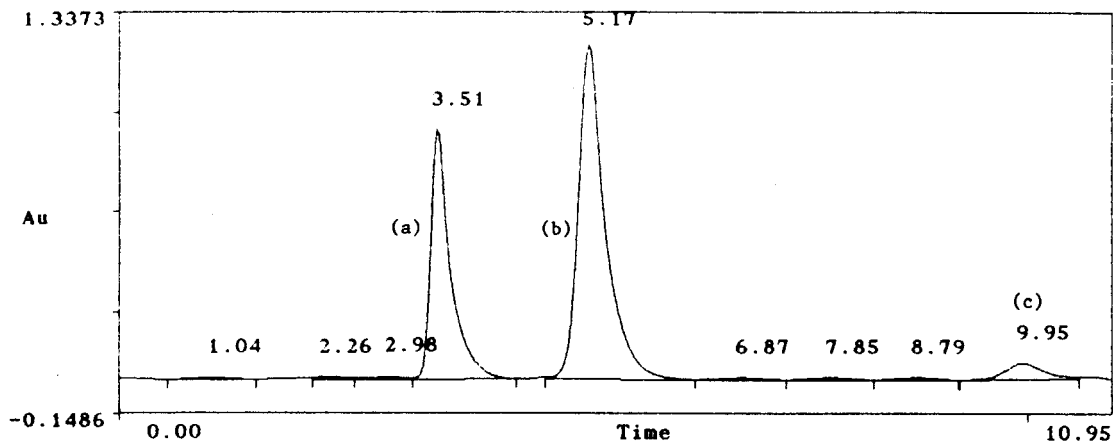
Fri Sep 15 19:12:58 1995

Fri Sep 15 19:01:54 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	2.000	90.0	10.0	1.0	254 - 0
6.00	****	****	****	****	*** - ***
12.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
1.04		241359	0.472	86214	0.317
2.26		263682	0.516	108620	0.399
2.98		330203	0.646	117570	0.432
3.51		16529122	32.358	11086122	40.701
5.17		30745874	60.189	14828454	54.441
6.87		259142	0.507	94977	0.349
7.85		278604	0.545	104451	0.383
8.79		310784	0.608	115443	0.424
9.95		2123717	4.159	695882	2.554

Cromatograma No. 5 Muestra estandar de los ácidos (a) tereftálico, (b) 4-carboxibenzaldehído y (c) benzoico, concentración de 0.5 g/L.

c:\lctalk\data\SOLA4A.011

Vial Number 01 Vial name prueba TA, CBA

Injection Number 1 Initial Pressure 2454 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

Fri Sep 15 19:01:13 1995

Original

c:\lctalk\method\AROMATI.mth

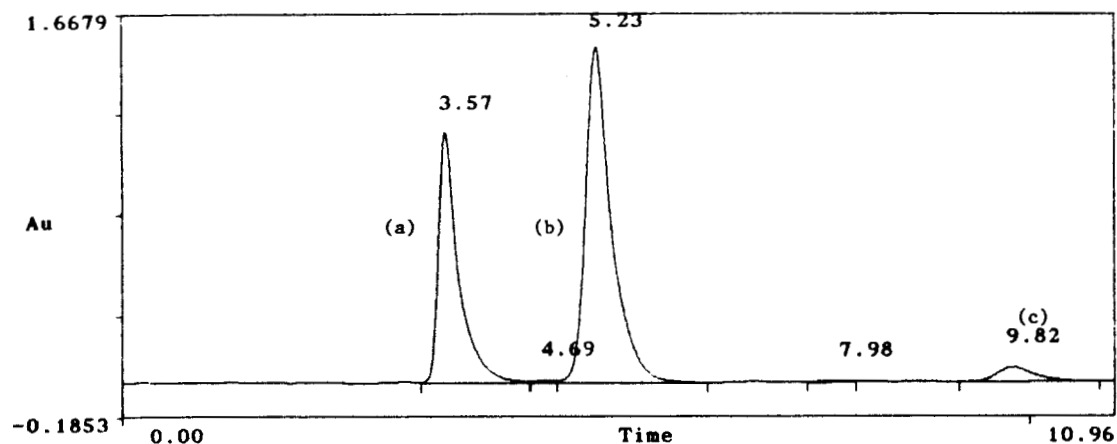
C:\LCTALK\SEQUENCE\AROMATI.SEQ

Fri Sep 15 18:50:08 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	2.000	90.0	10.0	1.0	254 - 0
6.00	****	****	****	****	*** - ***
12.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
3.57		21365052	34.764	13754502	41.284
4.69		229295	0.373	156393	0.469
5.23		37269652	60.644	18514130	55.570
7.98		214609	0.349	93037	0.279
9.82		2378058	3.870	798873	2.398

Cromatograma No. 6 Muestra estandar del ácido p-toluico, concentración de 0.1 g/L.

c:\lctalk\data\FIESTA4A.141

Vial Number 14 Vial name Acido p-toluico

Injection Number 1 Initial Pressure 2583 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

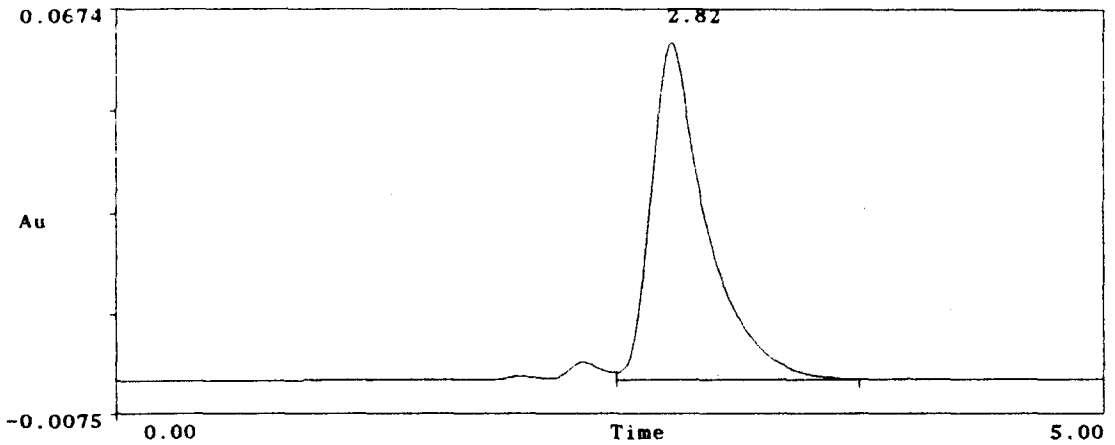
Fri Sep 15 13:39:35 1995

Fri Sep 15 13:34:31 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	1.500	50.0	50.0	1.0	254 - 0
5.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
2.82		1448596	100.000	744534	100.000

Cromatograma No. 7 Muestra estandar del ácido p-toluico, concentración de 0.2 g/L.

c:\lctalk\data\FIESTA4A.131

Vial Number 13 Vial name Acido p-toluico

Injection Number 1 Initial Pressure 2570 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

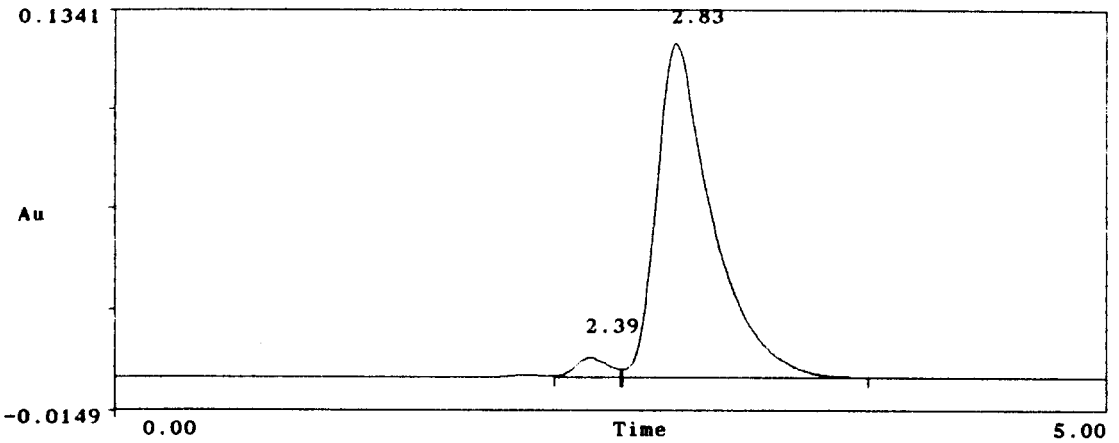
Fri Sep 15 13:28:54 1995

Fri Sep 15 13:23:50 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	1.500	50.0	50.0	1.0	254 - 0
5.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
2.39		102197	3.367	89376	5.665
2.83		2932826	96.633	1488328	94.335

Cromatograma No. 8 Muestra estandar del ácido p-toluico, concentración de 0.5 g/L.

c:\lctalk\data\FIESTA4A.121

Vial Number 12 Vial name Acido p-toluico

Injection Number 1 Initial Pressure 2590 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

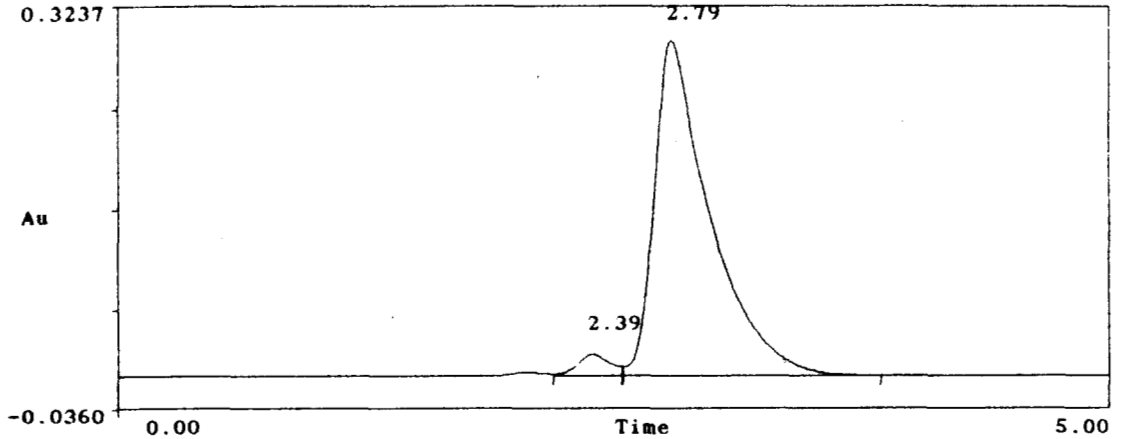
Fri Sep 15 13:21:38 1995

Fri Sep 15 13:16:33 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos



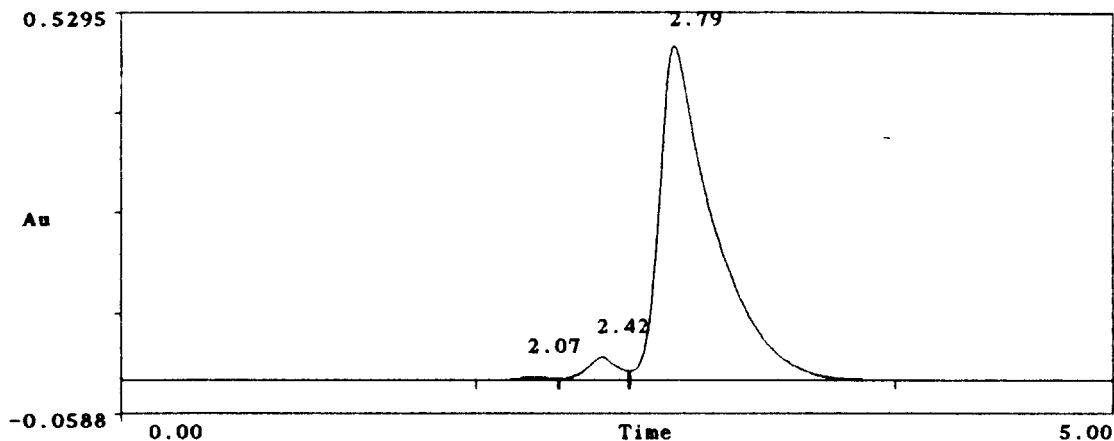
Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	1.500	50.0	50.0	1.0	254 - 0
5.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
2.39		267366	3.659	236856	6.195
2.79		7038785	96.341	3586776	93.805

Cromatograma No. 9 Muestra estandar del ácido p-toluico, concentración de 0.8 g/L.

Vial Number 11 Vial name Acido p-toluico
 Injection Number 1 Initial Pressure 2576 PSI
 Initial Wave 254 2 samples per sec
 Current Original
 c:\lctalk\method\TOLUICO.mth c:\lctalk\method\TOLUICO.mth
 C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ
 Fri Sep 15 13:13:34 1995 Fri Sep 15 13:08:31 1995

a=Water b=Metanol (90:10)
 uBondapak C-18 300x4.6 mm
 Compuestos Aromáticos



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	1.500	50.0	50.0	1.0	254 - 0
5.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
2.07		58507	0.497	56653	0.895
2.42		434739	3.697	404382	6.389
2.79		11267464	95.806	5868435	92.716

Cromatograma No. 10 Muestra estandar del ácido p-toluico, concentración de 1 g/L.

c:\lctalk\data\FIESTA4A.101

Vial Number 10 Vial name Acido p-toluico

Injection Number 1 Initial Pressure 2644 PSI

Initial Wave 254 2 samples per sec

Current

Original

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

c:\lctalk\method\TOLUICO.mth

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

C:\LCTALK\SEQUENCE\TOLUICO.SEQ

Fri Sep 15 13:06:30 1995

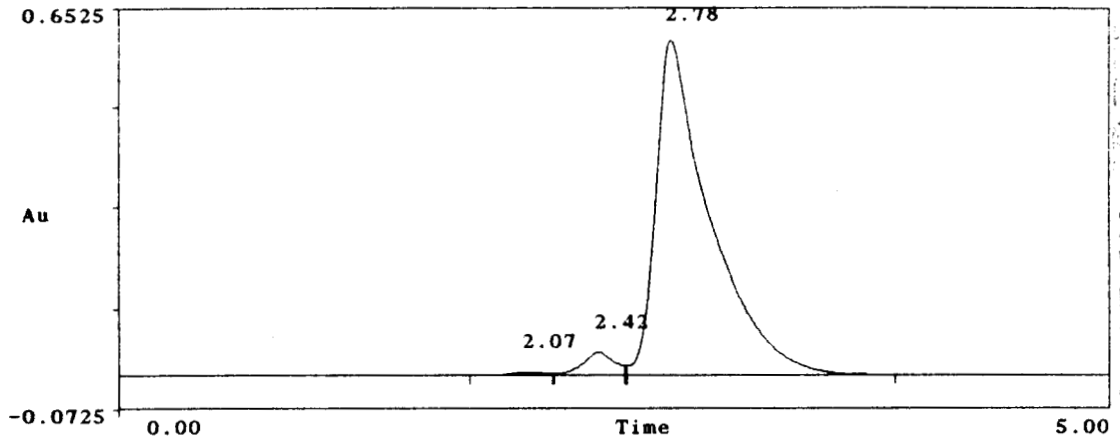
Fri Sep 15 13:01:26 1995

a=Water b=Metanol (90:10)

uBondapak C-18 300x4.6 mm

Compuestos Aromáticos

222411



Time	Flow	%A	%B	Exp	Wave
0.00	1.500	50.0	50.0	1.0	254 - 0
5.00	****	****	****	****	*** - ***

Retent	Peak Name	area	% Area	height	% Height
2.07		72777	0.507	68941	0.882
2.42		533889	3.716	502194	6.423
2.78		13761036	95.777	7247685	92.695

REFERENCIAS

Bidlingmeyer, B. A. 1992. *Practical HPLC Methodology and applications*. Ed. Awiley-Interscience Publication. New York, U.S.A.

Colin H., Ward N. and Guiochon, G. 1978. *Comparison of some packings for reversed-phase high-performance liquid-solid chromatography*. I. Some analytical considerations. *J. Chromatogr.* **149**:169-197.

Heftmann E., ed. 1992. *Chromatography, 5th edition. Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods. Part A : Fundamentals and techniques*. Journal of chromatography library Volume 51A.

Howard, G. A. and Martin, A. J. P. *J. Biochem.* **56**:532.

Ostvold G. 1983. *Characterization of petroleum residues by High-performance liquid chromatography*. *J. Chromatogr.* **282**:413-422.

Poppe, H. and Kraak C. 1983. *Influence of thermal conditions on the efficiency of high-performance liquid chromatographic columns*. *J. Chromatr.* **282**:399-412.

Snyder, L. R. 1974. *Role of the solvent in liquid-solid chromatography. A review*. *Anal. Chem.* **(46)** 11:1384.

Taylor, B. F. and Ribbons D. W. 1983. *Bacterial decarboxilation of o-phthalic acids*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1276-1281.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	2
Objetivos.....	3
Plan de trabajo.....	4
PRUEBAS DE BIODEGRADACION.	
Introducción.....	6
Antecedentes.....	7
Justificación.....	8
Metodología.....	10
Resultados y discusión.....	11
Gráficas de biodegradación.....	16
Referencias.....	22
TÉCNICA DE HPLC.	
Introducción.....	26
Fundamento.....	28
Materiales y métodos.....	29
Equipo.....	29
Reactivos.....	29
Procedimiento.....	30
Resultados y discusión.....	36
Curvas estandar.....	38
Cromatogramas.....	42
Referencias.....	52
Índice.....	53