



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ingeniería Química
Colegio de Ingeniería Ambiental

“Aplicación de la técnica HPLC en aguade nejayote tratada por electrooxidación”

TESIS

presentada como requisito para obtener el título de:
Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Johana Arellano Villegas

Asesor de Tesis:

Dra. María Teresa Zayas Pérez

Puebla, Pue.
Septiembre de 2015.





Es muy poco papel para poder expresar la gratitud que tengo hacia las personas que me han ayudado a lo largo de esta carrera llamada vida

En primer lugar agradezco a Dios por ser tan bueno conmigo, por darme las fuerzas, la paciencia, la inteligencia, la sabiduría y las energías para concretar esta etapa de mi vida.

Doy gracias a mis Padres Gabriel Arellano Mendoza y Audibe Villegas Sandoval , qué haría sin ustedes, me han enseñado tanto en el recorrido de la vida, estoy en deuda con ustedes para siempre, agradezco su paciencia, su bondad, su amor, su tiempo y todas aquellas cosas que me han enseñado con su ejemplo, gracias por hacerme una mujer de bien.

Gracias a mis hermanos, Paty, Ede, Yuri, Sam y Dani, gracias por todas las experiencias, los consejos, las risas la amistad y la ayuda que me han brindado, es algo que tengo siempre presente.

Dra. María Teresa Zayas Pérez gracias por su paciencia, su constancia, por brindarme de su sabiduría y conocimiento, sin duda alguna sin su dirección no habría podido concluir la Tesis, mi inmensa gratitud hacia usted.

Agradezco a mis amigos de la Facultad por regalarme momentos inolvidables, pese a que son muchos para mencionarlos uno por uno sabemos que somos 31 y Marisol gracias por brindarme tu maravillosa amistad, en serio he disfrutado mucho estar contigo en el laboratorio.

**Un poco de ciencia aleja de Dios,
pero mucha ciencia devuelve a Él.**

Louis Pasteur

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13

1. ANTECEDENTES.

1.1 Importancia del maíz como alimento en México.	15
1.2 Nejayote a partir del proceso de nixtamalización.	16
1.3 El nejayote como problema ambiental.	17
1.4 Procesos de Oxidación Avanzada.	18
1.5 La oxidación anódica como alternativa al tratamiento de aguas residuales.	19
1.6 Técnica de cromatografía líquida de alta eficacia.	20
1.6.1 Componentes del equipo.	21

2. METODOLOGÍA.

2.1. Reactivos, Materiales y Equipos.....	28
2.2 Muestras de nejayote tratadas por electrooxidación.	30
2.3. Ensayos preliminares para encontrar la fase móvil en muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica.	33
2.4. Separación de compuestos semejantes mediante la modificación de la relación %v:v de fase móvil y velocidad de flujo constante.	33
2.5 Separación de compuestos semejantes a diferentes velocidades de flujo y fase móvil constante.....	36

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Ensayos preliminares para encontrar la fase móvil en muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica.	39
3.2 Separación de compuestos de nejayote tratado mediante modificación de la fase móvil.	41
3.3 Evaluación a diferentes velocidades de flujo utilizando como fase móvil agua Milli-Q:ACN.....	44

3.4 Cromatogramas de las muestras de nejayote tratado por electrooxidación a diferentes valores de pH.....	48
3.5 Cromatogramas de las muestras de nejayote tratado por electrooxidación a diferentes tiempos de electrólisis.....	54
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de un equipo de HPLC.	22
Figura 2. Inyector de válvula.....	23
Figura 3. Inyector de jeringa.....	23
Figura 4. Equipo HPLC, con frascos para la fase móvil.....	24
Figura 5. Frasco para HPLC.....	24
Figura 6. Columna cromatográfica.....	25
Figura 7. Elementos de un pico cromatográfico.....	26
Figura 8. Equipo HPLC marca Perkin Elmer, modelo Serie 200 Pump.....	29
Figura 9. Muestras de nejayote tratadas por electrooxidación a diferentes pH y $T_E = 2.00$ h.....	30
Figura 10. Muestras de nejayote tratadas por electrooxidación a diferentes T_E y pH=12.....	30
Figura 11. Sistema de filtración al vacío o de fase móvil.	34
Figura 12. Sonicator ultrasónico.	34
Figura 13. Frascos de vidrio con tapa hermética que contienen Agua Milli-Q (A) y Acetonitrilo grado HPLC	35
Figura 14. Jeringa (a) e inyector (b) del equipo HPLC.....	35
Figura 15. Columna Cromatográfica.....	36
Figura 16. Monitor para variar la velocidad de flujo de la fase móvil del equipo de HPLC	37
Figura17. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: Acetonitrilo 65:35 v/v con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.	42
Figura18. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 60:40, v/v) y velocidad de flujo de 0.5 mL/min.	42
Figura 19. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 hrs., Fase Móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v y velocidad de flujo de 0.5 mL/min.....	43
Figura 20. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 50:50, v/v) y velocidad de flujo de 0.5 mL/min.....	43
Figura 21. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis	

de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.....	44
Figura 22. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.6 mL/min.....	45
Figura 23. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.....	45
Figura 24. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min.....	46
Figura 25. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.9 mL/min.....	46
Figura 26. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: acetonitrilo 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.....	47
Figura 27. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 3.0, fase móvil Agua:Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.	48
Figura 28. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 5.0, fase móvil Agua:Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.	49
Figura 29. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 7.0, fase móvil Agua:Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.	50
Figura 30. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 9.0, fase móvil Agua:Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.	51
Figura 31. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12.0, fase móvil Agua:Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.	52
Figura 32. Comparación de los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a diferentes valores de pH inicial	53
Figura 33. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 2.00$ h, fase móvil Agua: Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.....	54
Figura 34. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 2.15$ h, fase móvil Agua: Acetronitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.....	55
Figura 35. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 2.30$ h, fase móvil	

Agua: Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.....	56
Figura 36. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 2.45$ h, fase móvil	
Agua: Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.....	57
Figura 37. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 3.00$ h, fase móvil	
Agua: Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.....	58
Figura 38. Comparación de los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a diferentes tiempos de electrólisis.....	59

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sistema de disolventes utilizados en los ensayos de HPLC	39
Tabla 2. Porcentaje de la fase móvil Agua Milli Q: Acetonitrilo	40
Tabla 3. Diferentes porcentajes v/v de fases móvil Agua Milli Q: Acetonitrilo para la separación de los compuestos de nejayote tratado por oxidación anódica.....	41
Tabla 4. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=3.0.....	48
Tabla 5. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=5.0.....	49
Tabla 6. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=7.0.....	50
Tabla 7. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=9.0.....	51
Tabla 8. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH = 12.0.....	52
Tabla 9. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_e = 2.00$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.....	55
Tabla 10. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_e = 2.15$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.....	55
Tabla 11. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_e = 2.30$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.....	56
Tabla 12. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_e = 2.45$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.....	57
Tabla 13. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_e = 3.00$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.....	58
Tabla 14. Áreas expresadas en mV.sec de cada pico de los cromatogramas obtenidos de la serie de tiempo de electrólisis.....	60

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz es uno de los más diversificados en el mundo, ocupando el 3er lugar de importancia a nivel mundial después del trigo y el arroz; en México el maíz forma parte esencial de la alimentación mexicana, pues de él obtenemos la tortilla que es el principal suministro alimenticio en México, sin embargo en la preparación de masa ya sea para tortillas, tamales u otro alimento, el maíz es sometido a una cocción alcalina conocida como “nixtamalización” y de dicho proceso se obtiene como efluentes de agua el “nejayote”. El nejayote como agua residual contiene importantes cantidades de materia orgánica, cal, residuos de cascarilla y endospermo de maíz [1].

El nejayote en la mayoría de los casos es eliminado directamente al alcantarillado público o al suelo, convirtiéndose en un residuo alcalino altamente contaminante para el medio ambiente. Desafortunadamente en México aún se desconoce el tratamiento adecuado para tratar este tipo de agua residual, ya que en el proceso de nixtamalización se genera una gran cantidad de materia orgánica, lo que hace a muchos tratamientos inadecuados.

En la actualidad y debido a la importancia que representa el problema de las aguas residuales vertidas al alcantarillado sin un previo tratamiento, diversos grupos de investigación buscan una solución adecuada para el tratamiento de todo tipo de aguas residuales, se espera que cada vez los procesos para la descontaminación de aguas residuales sean más eficientes en la remoción de contaminantes como colorantes, compuestos aromáticos, plaguicidas, altas cantidades de materia orgánica, entre otros.

Entre los avances más importantes encontramos como alternativa los Procesos de Oxidación Avanzada (POA), los cuales se definen como “aquellos procesos de oxidación que implican la generación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en cantidad suficiente para interactuar con los compuestos orgánicos del medio” [2]. Entre las técnicas que componen las POA se encuentran Fotocatálisis TiO_2 , Foto-Fenton, $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, ozono (O_3) y los procesos electroquímicos en donde destaca la oxidación anódica como una opción bastante viable, que presenta ventajas importantes sobre otros tratamientos. Algunas ventajas son [3]:

- ✓ Potencialidad de eliminar altas cargas de diversos contaminantes.
- ✓ Capacidad de actuar sobre matrices complejas de distintos contaminantes debido al carácter no selectivo de los radicales hidroxilo.

- ✓ Pueden producir lodos en una menor cantidad que los procesos biológicos convencionales.
- ✓ Permiten además la transformación de contaminantes tóxicos en otros productos menos refractarios que pueden ser tratados por oxidación biológica.
- ✓ Es un proceso de gran versatilidad, en ocasiones muy sencillo de operar y que en su mayoría se dan a temperatura ambiente.
- ✓ Presenta una alta eficiencia en la remoción de materia orgánica.
- ✓ Compatibilidad con el ambiente.

Sin embargo es importante justificar y analizar el proceso de electrooxidación como una alternativa eficiente en cuanto a la degradación y depuración de contaminantes en aguas residuales de la industria del maíz. Por lo tanto, basándonos en este contexto se buscó estudiar y aplicar la técnica de HPLC para llevar a cabo la separación de los compuestos contenidos en el nejayote después del tratamiento por electrooxidación.

En el presente trabajo, el objetivo fundamental fue validar el método analítico para la separación de compuestos en muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica utilizando un ánodo de DDB (Diamante Dopado con Boro) a través de la técnica analítica de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia).

JUSTIFICACIÓN

El agua en las últimas décadas se está convirtiendo en un tema de interés vital para todo el mundo, ya que las nuevas tecnologías, el incremento de la población y la necesidad de abastecimiento cada vez mayor de alimentos en las ciudades han ocasionado una contaminación en muchos casos desmedida del agua.

En México se estima que cerca de 12 millones de personas carecen de agua y este número se incrementara en los siguientes años. El agua en México se distribuye principalmente para tres usos, agropecuario representando el 77% del agua disponible total en el país, abastecimiento para uso público 13 % y finalmente para uso industrial 10%, y aunque el agua utilizada para uso industrial solo representa un 10% la contaminación que genera en descargas orgánicas es 3 veces mayor que la que producen 100 millones de habitantes [4], lo que la convierte en un contaminador potencial del agua.

Una de las industrias más representativas en México es la del maíz, ya que el maíz constituye el alimento primordial en la dieta mexicana, sin embargo éste es sometido a una serie de procesos para que pueda llegar como un producto final a la población en general. El proceso más importante es la nixtamalización, entre las etapas que la componen tenemos la cocción alcalina del maíz y su lavado, en donde el agua es primordial para la obtención del nixtamal. Al finalizar el proceso de nixtamalización se desechan grandes cantidades de agua residual conocida como agua residual del maíz o nejayote, agua rica en materia orgánica y cal, efluente al que no se le da un tratamiento adecuado al ser vertido a cualquier cuerpo receptor, lo que genera una gran contaminación.

Por lo que en los últimos años se busca implementar procedimientos sustentables que puedan devolver de la mejor manera posible las condiciones físicas (color, turbidez, olor, temperatura) y químicas (DQO, DBO, eliminación de compuestos orgánicos e inorgánicos y/o exceso de materia orgánica) al agua que proviene de la industria del maíz.

Entre los procesos relativamente nuevos encontramos los procesos de electrooxidación que han demostrado ser una alternativa favorable para tratar diversos efluentes de la industria, ya que presenta gran eficacia al eliminar la materia orgánica y otros compuestos recalcitrantes difíciles de eliminar por medio de otros tratamientos.

OBJETIVO GENERAL

Aplicar la técnica HPLC en agua de nejayote tratada por electrooxidación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar una revisión bibliográfica sobre el equipo, manejo y técnica analítica de HPLC, así como del proceso de oxidación anódica.
- ✓ Realizar ensayos en la técnica de HPLC a partir de muestras de nejayote tratada mediante el método de electrooxidación a distintos valores de pH y T_e (tiempo de electrólisis) para la elección de la Fase Móvil.
- ✓ Realizar ensayos para la separación de compuestos semejantes a diferentes velocidades de flujo y fase móvil constante.
- ✓ Obtener 2 series de cromatogramas completos a partir de las condiciones que se seleccionaron como óptimas de muestras de nejayote tratada mediante el método de electrooxidación a distintos valores de pH y T_e .
- ✓ Analizar los distintos cromatogramas obtenidos mediante la técnica de HPLC de dos series de muestras de nejayote tratadas por electrooxidación.

The background of the page is a vibrant green scene. In the upper half, two clear water droplets are perched on a green leaf. The larger droplet on the left is in sharp focus, reflecting the surrounding greenery. The smaller droplet on the right is slightly out of focus. Below the leaf, the surface of water is visible, showing a clear reflection of the droplets and the leaf above. The overall lighting is bright and natural, creating a fresh and serene atmosphere.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Importancia del maíz como alimento en México.

“México, más que ningún otro país del Nuevo Mundo, es la tierra del maíz”

Edgar Anderson (1897-1969)

El nombre maíz, como se conoce en el mundo de habla española, proviene de mahís, una palabra del idioma taíno, cuyo idioma hablaban los pueblos indígenas de Cuba, justamente fue ahí donde los europeos tuvieron su primer encuentro con este tipo de cultivo, y debido a las características favorables de adaptabilidad y productividad esta planta comenzó a ser exportada desde América para otros países desde el siglo XVI y XVII.

El maíz es un alimento ancestral indispensable en el pasado y ahora en el presente para todas las culturas americanas. Forma parte tanto de la dieta alimenticia como del mundo mitológico del pueblo Maya y de sus descendientes actuales. Las grandes civilizaciones de Mesoamérica no habrían podido existir sin el maíz. Ese grano duro, blanquecino o amarillo fue el auténtico eje de su agricultura y base de su alimentación, sin lugar a dudas el maíz es una de las plantas más evolucionadas y aún en la actualidad su origen de domesticación y evolución se desconocen, porque ha llegado a nosotros altamente evolucionado, sin embargo para muchas civilizaciones como los indígenas mexicanos representa 10,000 años de cultura [5].

Para México el maíz representa el grano con mayor importancia y presencia, al ser parte esencial de toda una historia, una tradición y una cultura, ya que ancestralmente se ha producido para consumo de la población mexicana y en la actualidad es parte central de la dieta mexicana pues la mayor parte de alimentos producidos en el país son a base de él y se estima que se producen alrededor de 2.8 millones de toneladas métricas de maíz blanco y amarillo al año, utilizando cerca del 51.2 % de suelos cultivables alrededor de todo el país [6].

Es conocido que el maíz es rico en proteínas y por ende contiene aminoácidos esenciales (los cuales no son sintetizados por el cuerpo y se recomienda se consuman

en nuestra dieta diaria), además al someter el maíz a un adecuado proceso de nixtamalización encontramos un alimento rico en fibra dietaría soluble y calcio ya que puede presentar hasta 30 veces más calcio que el grano crudo [7]. Por esto y más el maíz sigue siendo el alimento básico para la dieta de las familias mexicanas.

1.2 Nejayote a partir del proceso de nixtamalización.

La mayor parte de alimentos en México son elaborados a base de maíz, desde la indispensable tortilla, hasta los platillos más tradicionales que podemos encontrar en el país, sin embargo para la mayoría de alimentos hechos de maíz, éste es sometido a una serie de procesos, entre ellos se encuentra la “nixtamalización”.

La palabra nixtamalización proviene del náhuatl nixtli, cenizas, y tamalli, masa, este proceso heredado desde los tiempos prehispánicos, no ha perdido su valor y ahora en la actualidad se sigue realizando de forma muy tradicional, se inicia con la adición de dos partes de una solución de cal aproximadamente al 1% a una porción de maíz. Esta preparación se cuece de 50 a 90 minutos, y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas [7]. Posterior al remojo, el agua resultante de la cocción, es conocida como nejayote, la cual se retira y el maíz es lavado dos o tres veces con agua, de ahí se obtiene el llamado maíz nixtamalizado.

1.3 El nejayote como problema ambiental.

La nixtamalización o cocción alcalina del maíz como ya se mencionó anteriormente es elemental para la realización de platillos mexicanos, sin embargo además de presentar altas ventajas nutrimentales, también trae consigo algunos inconvenientes, como son los efluentes generados después de la cocción y lavado del maíz. A estos efluentes se les conoce como “nejayote”, este tipo de agua contiene importantes cantidades de materia orgánica, cal, residuos de cascarilla y endospermo de maíz, convirtiéndose en un importante contribuyente a la polución del ambiente [1].

Se estima que se consumen 10.6 millones de toneladas de maíz procesado al año [6], y por lo tanto para procesar 1 tonelada de maíz se utilizan 1.64 m³ de agua, entonces se generan alrededor de 17.38 millones de m³ de agua residual proveniente de la nixtamalización y en la mayoría de los casos no se da un tratamiento adecuado o no recibe ningún tratamiento antes de ser vertido en el alcantarillado público.

El agua de nejayote presenta una gran carga de contaminantes y características físicas y químicas especiales, ya que contiene altas concentraciones de materia orgánica en suspensión (lo que ocasiona una alta DBO), después del proceso la temperatura es alta (60 y 80 °C) y tiene un pH cercano al límite máximo de alcalinidad (10 a 14) [8]. Por lo que es de suma importancia que reciban un proceso de tratamiento adecuado para ser incorporado al drenaje público.

Afortunadamente el problema que representan los efluentes de la industria del maíz poco a poco ha llamado la atención de diversos grupos de investigación y también de las industrias dedicadas especialmente a esta rama, aunque todavía se desconoce información respecto al nejayote y sobre un tratamiento adecuado para éste. Entre los métodos más utilizados están los tratamientos químicos, físico-químicos y biológicos, sin embargo la eficiencia que presentan algunos métodos en cuanto a la remoción de materia orgánica en muchas ocasiones es poco satisfactoria.

1.4 Procesos de Oxidación Avanzada.

Los procesos de oxidación avanzada (POA) prometen ser uno de los métodos más eficientes para la degradación de contaminantes no biodegradables contenidos en aguas residuales industriales. Los procesos más comunes son fotocátalisis TiO_2 , fotofenton, $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, O_3 y los procesos electroquímicos como la electrooxidación u oxidación anódica.

Los Procesos de Oxidación Avanzada se basan en la generación de radicales Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), los cuales se caracterizan de ser agentes con un alto potencial de oxidación, además de no ser selectivos, logrando tratar a una gran cantidad de contaminantes [9].

Las principales ventajas que presentan las POA son:

- ✓ Capacidad potencial para llevar a cabo una profunda mineralización de los contaminantes orgánicos y oxidación de compuestos inorgánicos hasta dióxido de carbono e iones (cloruros, nitratos, etc.).
- ✓ Reactividad con la inmensa mayoría de compuestos orgánicos, hecho especialmente interesante dado que el tratamiento biológico secundario y los tratamientos químicos convencionales no consiguen una adecuada degradación de ciertos contaminantes.
- ✓ Descomposición de los reactivos utilizados como oxidantes en productos inocuos, por lo que entra en la categoría de tecnología limpia.
- ✓ Sistemas de tratamiento modulares, compactos y totalmente automatizables, permitiendo la posibilidad de operar tanto en continuo como en discontinuo [10].

La desventaja se presenta en cuanto a un alto costo comparado con los procesos biológicos, sin embargo el uso de un POA puede mejorar la biodegradabilidad de aguas residuales o lograr una casi completa remoción utilizándolo como pre-tratamiento o post-tratamiento respectivamente [10].

1.5 La oxidación anódica como alternativa al tratamiento de aguas residuales.

La oxidación anódica (OA) o electrooxidación como método de tratamiento electroquímico, en los últimos años ha cobrado importancia y su estudio se ha hecho cada vez más frecuente, ya que representa una eficiente alternativa a diversos problemas ambientales en la industria de procesos, debido a que el electrón utilizado como reactivo es versátil, eficiente, rentable, fácilmente automatizable y además es un reactivo limpio [11]. Presentándose en la actualidad una gran variabilidad de ánodos, y en las últimas décadas los ánodos de DDB (Diamante Dopado con Boro) han representado una opción de estudio innovadora y eficiente en el tratamiento de aguas residuales.

EL proceso de oxidación anódica se basa en la degradación oxidativa de los compuestos químicos presentes en el agua residual a través de reacciones anódicas, donde la oxidación de los compuestos presentes se lleva a cabo en el ánodo y su reducción en el cátodo [12].

En el proceso de OA al utilizar un ánodo como el DDB, presenta atractivas ventajas frente a otros tipos de ánodos ya que los ánodos dopados con boro están recubierto con diamante lo que les permite tener una alta conductividad térmica, además de presentar una alta eficiencia en la remoción de contaminantes orgánicos ya que los convierten en ácidos carboxílicos y posteriormente los oxidan a bióxido de carbono [12].

La OA como técnica electroquímica ha llevado a cabo estudios sobre la desinfección y purificación de aguas residuales contaminadas, eliminando compuestos orgánicos recalcitrantes o refractarios a partir de aguas residuales textiles [13,14], o a partir de aguas residuales con un alto contenido de cromo [15], incluso agua residual de nixtamalización o nejayote [12].

Con el objeto de probar la eficacia del tratamiento, en cuanto a la degradación de compuestos orgánicos, es de suma importancia analizar la calidad del agua tratada.

Una alternativa fiable para el análisis de agua tratada es la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), técnica que se ha convertido en los últimos 35 años en el método de separación analítico por excelencia, convirtiéndose en el tercer equipo estándar en los laboratorios analíticos [16].

Muchos trabajos de investigación se apoyan en esta técnica debido a la fiabilidad de los resultados y como una herramienta de uso rápido, en el área ambiental, específicamente en el tratamiento de aguas residuales, resulta ser una atractiva alternativa para la separación y cuantificación de los compuestos obtenidos, así como un instrumento útil para la comparación del efluente residual antes (sin tratamiento previo) y después de haber aplicado un tratamiento de remoción de contaminantes, permitiendo evaluar la calidad del agua.

En cuanto al análisis de agua por análisis por HPLC, se han realizado trabajos desde distintos enfoques. Por ejemplo, Amaro (2005) estudio el contenido de Cr (VI) y Cr (III) en aguas de una industria de cromado antes y después de ser pasadas por un proceso de conversión y eliminación. Dawson y col. (2003), midieron las concentraciones de cloramina-T en aguas destinadas al cultivo de peces; Zhou y col. (1994), determinaron nitritos en agua; Sarno y Delfino (2001) cuantificaron compuestos fenólicos.

1.6 Técnica de cromatografía líquida de alta eficacia.

La finalidad del técnica consiste en la separación de los diferentes componentes de una muestra como resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la misma, las cuales fluyen a través de una fase móvil y son retenidas selectivamente en una fase estacionaria (columna cromatográfica) de acuerdo a la polaridad que presenten [17].

La Cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente como herramienta analítica en diversas áreas de investigación, siendo de gran relevancia en casi todas las áreas de análisis instrumental por varias razones [18]:

- a) grado de automatización que ha alcanzado con las computadoras y el software
- b) capacidad y variedad de sus columnas
- c) diversidad de fases móviles a emplear
- d) detectores no destructivos
- e) inyección directa de mezclas complejas
- f) eficiencia y rapidez en el análisis de compuestos comparado con los métodos convencionales
- g) detección de iones inorgánicos en bajas concentraciones.

1.6.1 Componentes del equipo.

Si bien es lógico pensar que para la realización de este tipo de cromatografía solo debemos disponer de dos fases y una columna, en la actualidad y debido a que el diámetro de las partículas suele ser muy pequeño, ya se cuentan con dispositivos que facilitan y mejoran los resultados por HPLC. Por lo tanto, los componentes básicos de un equipo HPLC (Figura 1), son los siguientes:

- ♣ Dispositivo de inyección.
- ♣ Fase móvil.
- ♣ Detector UV.
- ♣ Columna.
- ♣ Bomba.
- ♣ Registrador de datos.

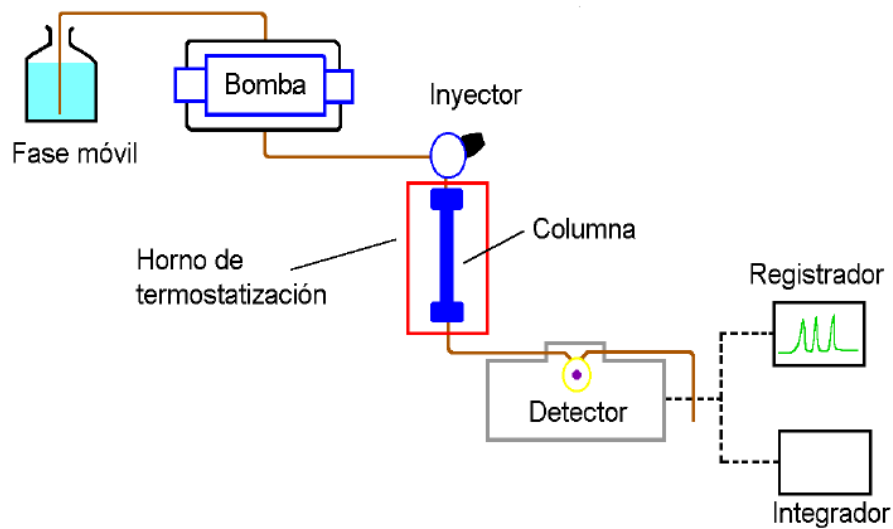


Figura 1. Esquema de un equipo de HPLC.

Dispositivo de inyección: El inyector sirve para introducir la muestra líquida en la corriente de flujo de la fase móvil. Los volúmenes de muestras van de 5 a 20 μm . Es indispensable destacar que un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica que deterioraría los resultados obtenidos.

Las características que debe presentar un adecuado sistema de inyección son las siguientes:

- ✓ Fácil manejo.
- ✓ Debe ser capaz de soportar las altas presiones del sistema de líquido.
- ✓ Al introducir la muestra a la columna sea capaz de obtener una banda lo más estrecha posible.
- ✓ Dar lugar a resultados reproducibles.

Existen 2 tipos de inyectores de muestra, inyector de jeringa (Figura 2) e inyector de válvula (Figura 3).

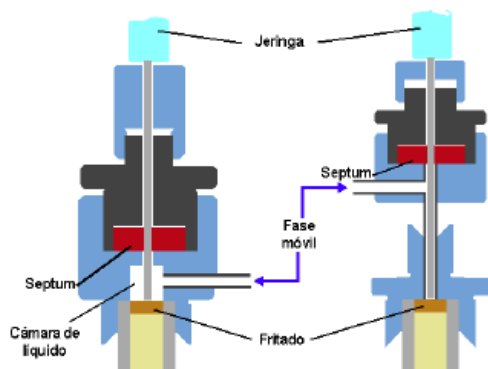


Figura 2. Inyector válvula.

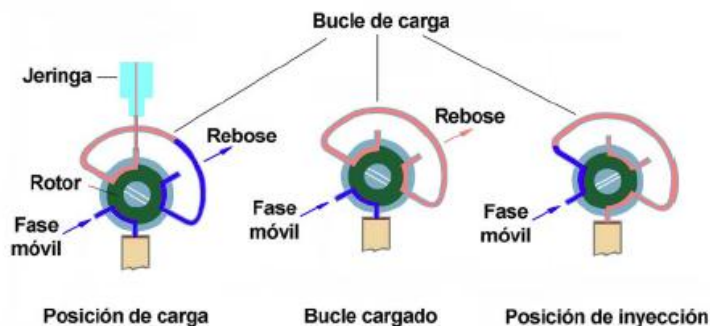


Figura 3. Inyector jeringa

El medio más simple y antiguo utilizado es la introducción de la muestra por medio de una jeringa, la ventaja de esta técnica es su sencillez, sin embargo la reproducibilidad de la inyección con jeringa rara vez es mejor de un 2 o 3% del 100% y con frecuencia no se considera muy recomendable.

Fase móvil: La muestra se disuelve en un disolvente que representa a la fase móvil y su función es la de arrastrar los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria contenida en la columna cromatográfica como por ejemplo: sílice, alumina. En la fase estacionaria los componentes de la muestra se distribuyen de acuerdo a la variación de la velocidad con que son arrastrados por la fase móvil.

Para la fase móvil se utilizan 2 frascos de vidrio con tapa hermética (Figura 5), los cuales deben estar perfectamente limpios y secos. Un frasco (reservorio A) contendrá agua tridestilada y el otro frasco contendrá el o los disolvente (reservorio B) que se deseen utilizar con un alto grado de pureza o grado HPLC.

La fase móvil (Figura 4) puede ser:

Isocrática: composición de la fase móvil constante.

En gradiente: composición de la fase móvil basada en el tiempo.



Figura 4. Equipo HPLC, con frascos para la fase móvil. Frasco con agua (reservorio A) y frasco con disolvente (reservorio B).



Figura 5. Frasco para HPLC.

La bomba de presión: Es suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, un sistema de bombeo ideal debe soportar elevadas presiones (arriba de los 6.000 psi). La bomba de presión debe estar construida de materiales químicamente inertes a la fase móvil y proporcionar un sistema libre de pulsaciones, además de suministrar flujos adecuados para cada tipo de columna e intervalos de caudales que van desde 0.1 mL/min hasta 10 mL/min, además el caudal que suministre debe ser constante.

Detector UV: Es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste. Podemos expresar que el detector son los "ojos" de un cromatógrafo. El detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

El fundamento está basado en emitir radiación electromagnética en la región UV a través de compuestos químicos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía a una longitud de onda específica. Esta energía provoca el paso de un electrón de un estado fundamental hasta un nivel superior de energía.

En los detectores UV la línea base representa la máxima transmisión de luz, y cualquier desviación de ella indicará pérdida o absorción de luz.

Columna: En la columna cromatográfica se produce la separación de los componentes de una muestra y son tubos de acero inoxidable, con un diámetro interno uniforme y de relleno variable (Figura 6), su capacidad de separación vendrá marcada por:

- ♣ Propiedades físicas: eficacia y velocidad.
- ♣ Propiedades químicas: estabilidad química y sensibilidad (tiempo de retención).



Figura 6. Columna cromatográfica.

Registrador de datos: transforma las señales provenientes del detector en un gráfico de señal vs tiempo, llamado cromatograma (Figura 7), el cual nos informa sobre la separación, el tiempo de retención y la concentración de los componentes presentes en la muestra analizada.

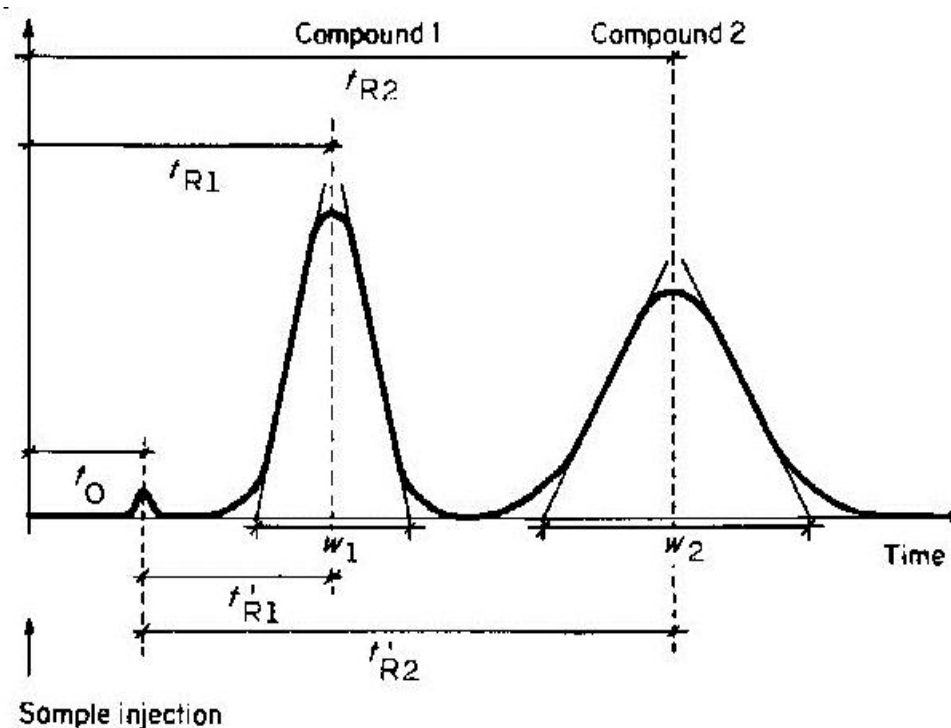


Figura 7. Elementos de un pico cromatográfico (t_R : **tiempo de retención**.- tiempo que tarda cada sustancia en abandonar el sistema cromatográfico. Esta retención se ejerce en función de las características moleculares de cada compuesto., **h: altura del pico**.- Medida que se efectúa, para cada pico de interés, desde la línea base hasta el máximo del pico., **w: anchura del pico**.- Es la longitud del tramo de la prolongación de la línea de base, comprendida entre las intersecciones con la misma de las laderas del pico., **t₀: tiempo de un compuesto no retenido**.- es el tiempo de retención del componente inerte o gas portador).

Cada uno de los elementos mencionados son indispensables para obtener un buen cromatograma, es importante tomar en cuenta que a la hora de elegir la fase móvil y la columna cromatográfica, debe ser en base a la naturaleza de la sustancia a separar.

A close-up photograph of two clear water droplets resting on a vibrant green leaf. The droplets are perfectly spherical and reflect the surrounding greenery. The background is a soft, out-of-focus green, creating a serene and natural atmosphere.

Capítulo 2

A decorative flourish consisting of a horizontal line with elegant, symmetrical scrollwork and leaf-like patterns extending from the center.

Metodología

2.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.

Disolventes grado HPLC y reactivos.

- Metanol grado HPLC.
- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC.
- Solución buffer de fosfato de sodio (NaH_2PO_4), 0.03 M, pH=2.5
- Agua Milli:Q.

Materiales.

- Botellas de vidrio para esterilización con rosca.
- Membranas de nylon resistentes al disolvente.
- Filtros de jeringa 0.20 μm

Equipos.

Sonicador de baño ultrasónico.

Sistema de Filtración al vacío.

Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia HPLC (Figura 8).

Características del equipo HPLC:

Cromatógrafo líquido.

HPLC marca Perkin Elmer, modelo Serie 200 Pump, con un “loop” de inyección de 20 μL .

Bomba:

Serie 200 LC. (Marca Perkin Elmer)

Fase estacionaria:

Columna: Marca Grace, EPS C18 100 A.

Tipo: Fase Reversa.

Longitud: 150mm.

Diametro Interno (ID): 4.6 mm.

Diametro de Partícula (DP): 5 μ .

Presión máxima: 5000 psig.

Flujo Máximo: 1 mL/min. [25]

Fase Móvil:

Reservorio A: Agua Milli-Q.

Reservorio B: El disolvente que se indique.

Fase móvil: Según se especifique en cada condición.

Flujo de fase móvil: Según se especifique en cada condición, en (mL·min⁻¹).

Detector:

UV/Visible Serie 200 (Marca Perkin Elmer)

Longitud de onda de análisis: 254 nm. (Recomendada para la columna EPS C18 Fase Reversa)

Sistema de Integración:

Turbochrom, software para Windows 98.



Figura 8. Equipo HPLC marca Perkin Elmer, modelo Serie 200 Pump.

2.2 MUESTRAS DE NEJAYOTE TRATADAS POR ELECTROOXIDACIÓN.

Las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica fueron obtenidas de un trabajo de tesis previo, realizado en el laboratorio de Química Ambiental del ICUAP, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Zayas Pérez [12]. El trabajo consistió en la remoción de contaminantes presentes en nejayote o agua residual del proceso de nixtamalización aplicando el tratamiento de oxidación anódica, empleando un ánodo de DDB (Diamante Dopado con Boro). Se evaluó el efecto de pH y tiempo de electrólisis durante el tratamiento. La Figura 9 presenta las muestras de nejayote que se obtuvieron del proceso de electrooxidación, evaluando el efecto de los diferentes valores de pH inicial a un tiempo de electrólisis (T_E) de 2.00 h, y la Figura 10 presenta las muestras de nejayote a un pH=12 y diferentes tiempo de electrólisis.

Por lo tanto, cabe aclarar que las muestras proporcionadas para validar el método analítico por la técnica de HPLC de las muestras de nejayote tratadas por electrooxidación, fueron la serie del efecto o variación del pH inicial (3, 5, 7, 9, 12) y la serie de efecto del tiempo de electrólisis (120, 135, 150, 165, 180 min.)

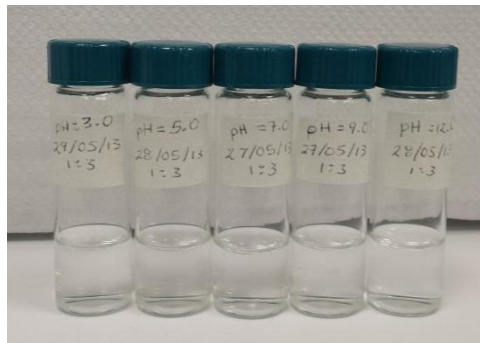


Figura 9. Muestras de nejayote tratadas por electrooxidación a diferentes pH y $T_E = 2.00$ h.



Figura 10. Muestras de nejayote tratadas por electrooxidación a diferentes T_E y pH=12.

En el Diagrama 1 se resumen las etapas desarrolladas para el tratamiento de nejayote por oxidación anódica [13].

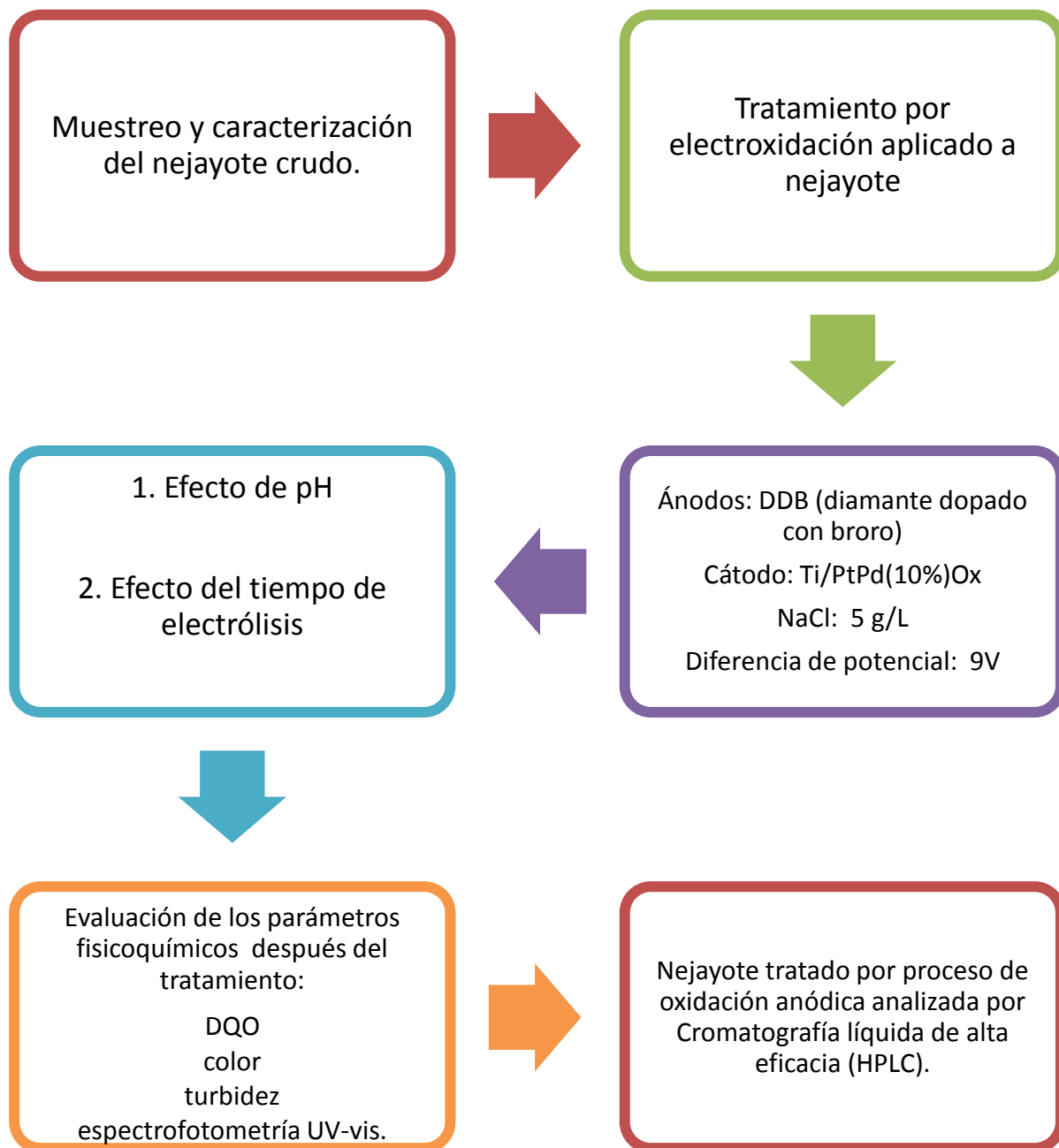


Diagrama 1. Etapas desarrolladas para el tratamiento de electrooxidación anódica.

En el Diagrama 2 se resumen las etapas desarrolladas para el presente trabajo, a partir de las muestras tratadas por electrooxidación considerando el efecto de pH y tiempo de electrólisis.

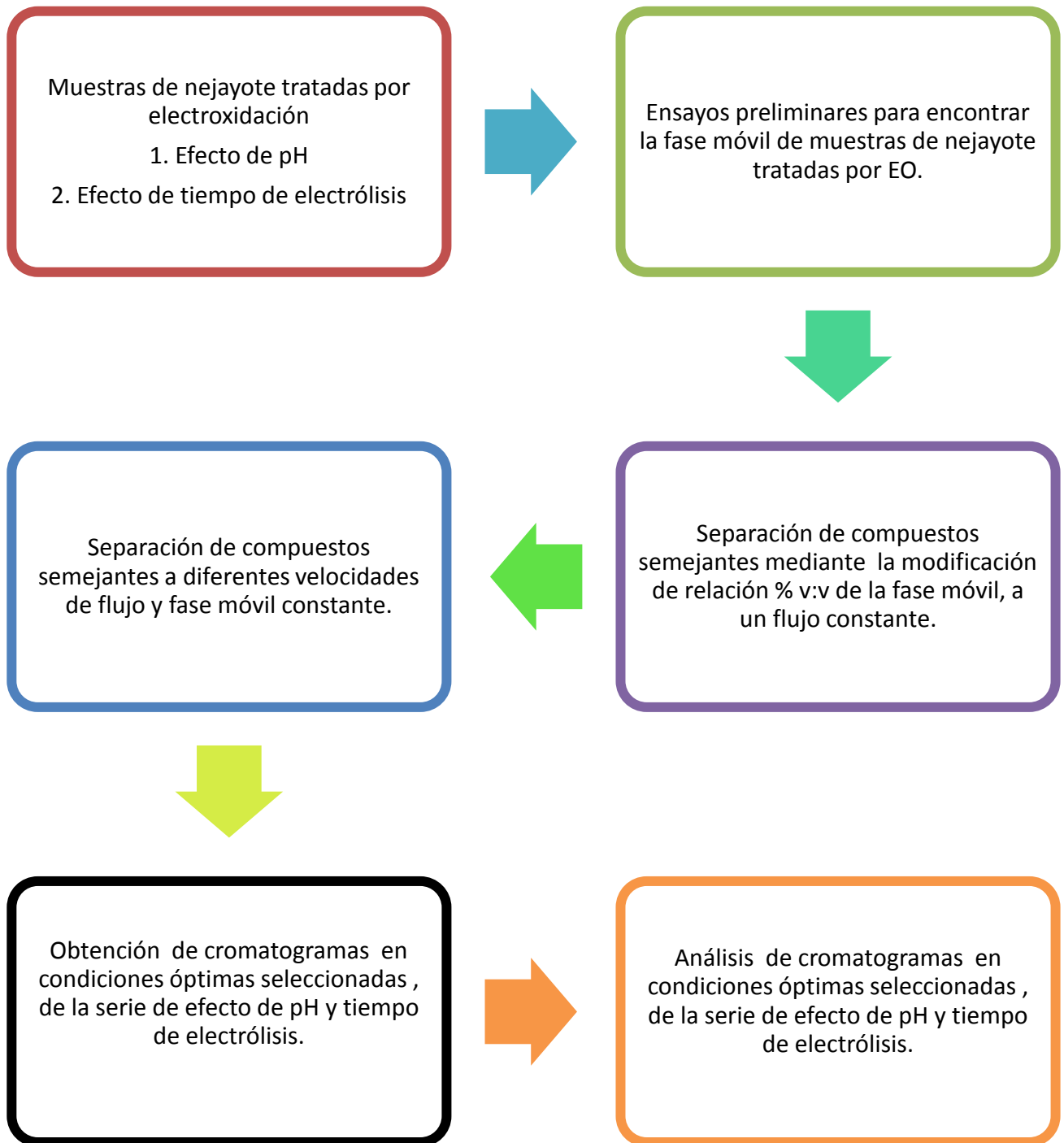


Diagrama 2. Etapas desarrolladas para validar la técnica de separación de compuesto presente en las muestras de nejayote tratadas por electrooxidación

2.3. ENSAYOS PRELIMINARES PARA ENCONTRAR LA FASE MÓVIL EN MUESTRAS DE NEJAYOTE TRATADAS POR OXIDACIÓN ANÓDICA.

Se realizaron una serie de ensayos en el equipo HPLC utilizando la muestra de nejayote tratada por oxidación anódica a un pH=5 y tiempo de electrólisis ($T_E=2.0$ h), en diluciones 1:3, con la finalidad de encontrar los disolventes que funcionen como fase móvil y fueran capaces de separar los componentes de la muestra en estudio a una longitud de onda de 254 nm (detector del equipo) para este trabajo de investigación.

Se seleccionaron 3 disolventes grado HPLC, agua, metanol, acetonitrilo y adicionalmente una solución buffer de fosfato de sodio. Los disolventes puros y/o mezcla de disolventes y la solución de fosfato de sodio son recomendados ampliamente para ser utilizados en el equipo HPLC [17], así como para la separación de compuestos en aguas residuales.

Los reservorios o sistemas de disolventes utilizados en los ensayos fueron los siguientes:

1. **Reservorio A.** Agua Milli-Q.
Reservorio B. Metanol grado HPLC.
2. **Reservorio A.** Agua Milli-Q.
Reservorio B. ACN grado HPLC.
3. **Reservorio A.** Agua Milli-Q.
Reservorio B. Solucion Buffer de Fosfato de sodio.
4. **Reservorio A.** Agua Milli-Q.
Reservorio B. Metanol:Agua: Acetronitrilo (ACN) (40:10:50, v/v)

2.4. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS SEMEJANTES MEDIANTE LA MODIFICACION DE LA RELACION %V:V DE FASE MÓVIL Y VELOCIDAD DE FLUJO CONSTANTE.

El procedimiento para optimizar la separación de compuestos semejantes después de encontrar la fase móvil fue el siguiente:

1. La mezcla de disolventes Agua Milli-Q: ACN o fase móvil utilizados en el equipo HPLC, se filtraron dos veces a través de un sistema de filtración marca Shott Duran (Figura 11), con filtros o membranas de nylon de $0.20\ \mu\text{m}$ (Marca Grace).



Figura 11: Sistema de filtración al vacío o de fase móvil.

2. Los disolventes Agua Milli-Q: ACN una vez filtrados fueron desgasados por medio de un sonicador ultrasónico marca Branson (Figura 12). El reservorio A (agua Milli-Q) fue sonificado 5 minutos y del reservorio B (ACN) durante 3 minutos.



Figura 12. Sonicador ultrasónico.

3. Se instalaron adecuadamente los reservorios en el equipo HPLC como se puede ver en la Figura 13.

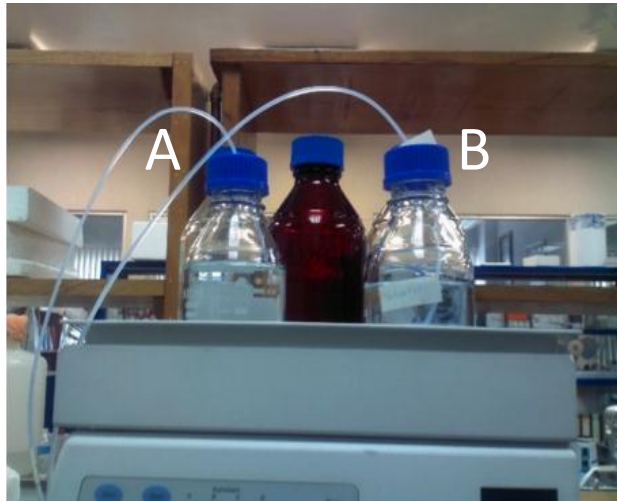


Figura 13. Frascos de vidrio con tapa hermética que contienen Agua Milli-Q (A) y ACN grado HPLC (B)

4. Posteriormente se iniciaron los experimentos, creando la línea base para evitar una variación considerable de ruido en el equipo. Se procedió a inyectar la muestra de estudio (Figura 13), la cual debe estar previamente filtrada, a través de filtros de nylon de $0.20\ \mu\text{m}$ (Marca Grace), con la finalidad de inyectar la muestra sin ningún tipo de partículas que causen algún problema en la columna cromatográfica (Figura 14).

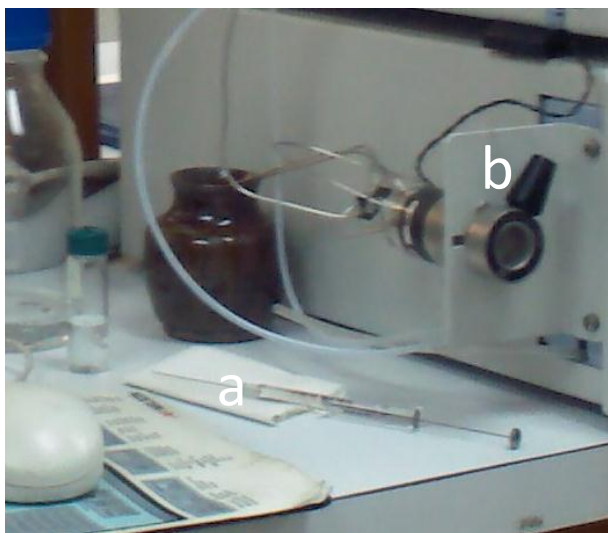


Figura 14. Jeringa (a) e inyector (b) del equipo HPLC



Figura 15. Columna cromatográfica.

5. En sistemas de disolventes o fase móvil Agua Milli-Q: ACN se fue variando en una relación Agua Milli-Q: ACN (v/v) cada 5% a una velocidad a flujo constante de 0.5 mL/min, con la finalidad de elegir la relación del porcentaje de v/v de la fase móvil, capaz de separar de manera óptima los compuestos presentes en la muestra de nejayote tratada por oxidación anódica para la muestras de nejayote tratadas a diferentes pH y tiempos de electrólisis.
6. Finalmente es importante que cada vez que se desee cambiar el disolvente, se purgue el equipo para evitar errores en los cromatogramas o burbujas en la columna cromatografica.

2.5 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS SEMEJANTES A DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO Y FASE MÓVIL CONSTANTE.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos para tratar de encontrar una separación óptima de compuestos de la muestra de nejayote tratada variando las velocidades de

flujo de la fase móvil Agua Milli-Q: ACN, entre un intervalo de 0.5 hasta 1.0 mL/min y de 0.1 en 0.1 mL/min (Figura 16).

El aumento o disminución del flujo de la fase móvil se realizó lentamente ya que se debe evitar dañar la bomba de presión del equipo.



Figura 16. Monitor para variar la velocidad de flujo de la fase móvil del equipo de HPLC .

The background of the entire page is a close-up photograph of two clear water droplets resting on a vibrant green leaf. The droplets are in sharp focus, reflecting light and showing the texture of the leaf. The background is a soft, out-of-focus green, creating a serene and natural atmosphere.

Capítulo 3

A decorative flourish consisting of a horizontal line with elegant, symmetrical scrollwork and leaf-like patterns extending from the center.

Resultados y Discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ENSAYOS PRELIMINARES PARA ENCONTRAR LA FASE MÓVIL EN MUESTRAS DE NEJAYOTE TRATADAS POR OXIDACIÓN ANÓDICA.

Los sistemas de disolventes utilizados en los ensayos en el equipo de HPLC para las muestras tratadas por electrooxidación se presentan en la tabla 1 y fueron los siguientes:

Tabla 1. Sistema de disolventes utilizados en los ensayos de HPLC.

Reservorio A	Reservorio B
Agua Milli-Q	Metanol grado HPLC
Agua Milli-Q	ACN grado HPLC
Agua Milli-Q	Solucion Buffer de Fosfato de sodio
Agua Milli-Q	Metanol:Agua:Acetonitrilo (40:10:50, v/v)

Los disolventes grado HPLC fueron seleccionados de acuerdo a las características que deben cumplir los disolventes como fase móvil, ya que la influencia del disolvente es muy importante, como por ejemplo capacidad de la fuerza para eluir al soluto, las interacciones totales entre una molécula de la fase móvil y una molécula de soluto, por ejemplo; interacciones de dispersión, dipolo-dipolo, enlace de hidrógeno, iónicos y de transferencia de carga.

Se observó que cuando la fase móvil fue metanol o agua, disolventes que presentan alta polaridad debido al grupo –OH que presentan, provocó que los analitos de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica eluyeran rápidamente por la fase estacionaria, y no se observó una separación adecuada, por lo que, los cromatogramas solo mostraron ruido y ningún pico. En nuestro caso se utilizó una columna cromatográfica en fase reversa lo cual implica que la fuerza de la fase móvil aumenta al disminuir su polaridad. En cromatografía en fase reversa, la retención es menor para la fase móvil más fuerte, que son las más polares (los compuestos hidrofílicos (polar) son menos retenidos y eluyen primero) y los compuestos más hidrofóbicos (no polares) son retenidos más fuertemente.

La retención de un analito se puede incrementar añadiendo más agua a la fase móvil; haciendo la afinidad del analito hidrofóbico por la fase estacionaria hidrofóbica, más afín que por la fase móvil, ahora más hidrofílica. De igual manera, la retención puede disminuir añadiendo mayor cantidad de disolvente orgánico a la fase móvil [26].

Cuando las fases móviles fueron Agua Milli-Q: Solución Buffer de Fosfato de Sodio y Agua Milli-Q: Metanol: Agua: ACN (40:10:50, v/v), no se observó ninguna separación de componentes eficaz.

Los resultados de las diferentes fases móviles o sistemas de disolventes probados mostró que la mezcla de agua Milli-Q y ACN con los porcentajes que se muestran en la Tabla 2, presentaron una separación de los diferentes componentes de la muestra de nejayote tratada por oxidación anódica, por lo que se determinó que la mezcla agua Milli-Q y ACN como fase móvil fue la más adecuada para la separación de compuestos en las muestras de nejayote tratadas. En donde el disolvente acetonitrilo es menos polar (constante dieléctrica 37) que el agua (constante dieléctrica 82).

Tabla 2. Porcentaje de la fase móvil Agua Milli Q: Acetonitrilo relación v: v

Reservorio A (Agua Milli:Q) %	Reservorio B (ACN) %
70	30
65	35
60	30
55	45
50	50

También es importante tomar en cuenta la fuerza de arrastre del disolvente, que está relacionada con la polaridad, entre menos polar sea el disolvente mayor fuerza de arrastre tendrá, a continuación se muestra la sucesión de fuerza de arrastre de acuerdo al tipo de disolvente [28].

Agua (el más débil) < metanol < **acetonitrilo** < etanol < tetrahidrofurano
< propanol < cloruro de metileno (el más fuerte)

El reservorio Agua Milli-Q:Acetonitrilo (v:v) presenta mayor fuerza de arrastre respecto a los demás sistemas conformados para este experimento, además el acetonitrilo presenta baja viscosidad con respecto al agua y al metanol lo que permite de cierta manera una mayor eficacia en la columna cromatográfica y la presión a utilizar es menor.

3.2 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS DE NEJAYOTE TRATADO MEDIANTE MODIFICACIÓN DE LA FASE MÓVIL.

La separación de compuestos de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica para los diferentes valores de pH (3, 5, 7, 9 y 12) a un tiempo de electrólisis de 2.00 h y las muestras de tiempo de electrólisis (2.0, 2.15, 2.30, 2.45 y 3.00 h) a un pH=12, se llevó a cabo con la fase móvil de agua Milli-Q: ACN (v/v) grado HPLC, variando los porcentaje v/v de acuerdo a la tabla 3.

Los diferentes porcentajes utilizando como fase móvil agua Milli-Q: ACN (v/v) que mostraron una mejor separación para la muestra de nejayote tratada por electrooxidación a un pH=5 y $T_E=2.00$ hrs. se muestran a continuación en la tabla 3. Todas las muestras tratadas para su análisis por la técnica de HPLC fueron diluidas en una relación de 1:3.

Tabla 3. Diferentes porcentajes v/v de fase móvil Agua Milli Q: ACN para la separación de los compuestos de nejayote tratado por oxidación anódica.

Reservorio A (Agua Milli:Q) %	Reservorio B (Acetonitrilo) %
65	35
60	40
55	45
50	50

Los cromatogramas obtenidos de la muestra de nejayote tratadas por electrooxidación a pH = 5.0 y tiempo de electrólisis de 2.00 hrs, a flujo constante de 0.5 mL/min., utilizando como fase móvil agua Milli-Q: ACN (v/v) en las relaciones porcentuales 50/50, 65/35,

55/45 v/v, corresponden a los cromatogramas con una mejor separación de los componentes de la muestra (figuras 17 a 20).

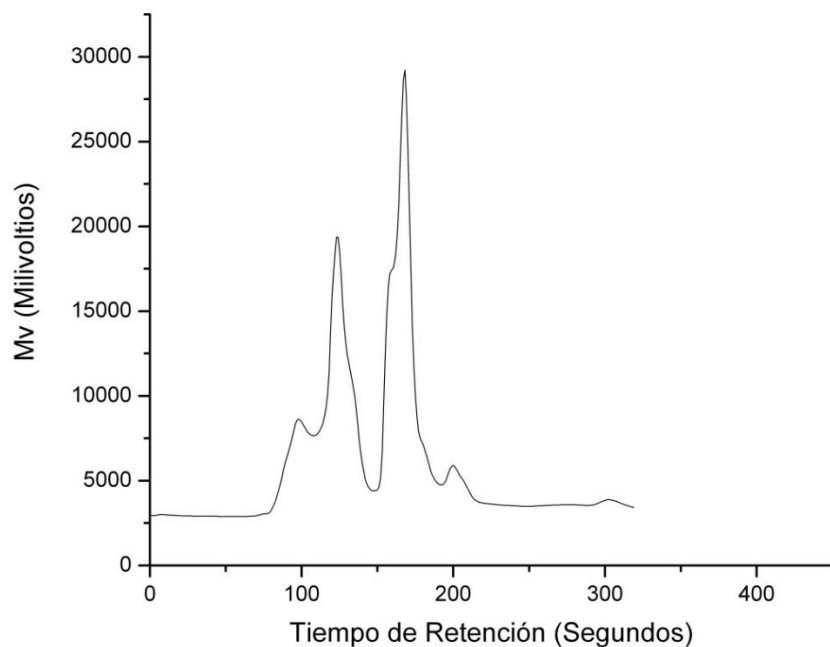


Figura17. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 65:35 v/v con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

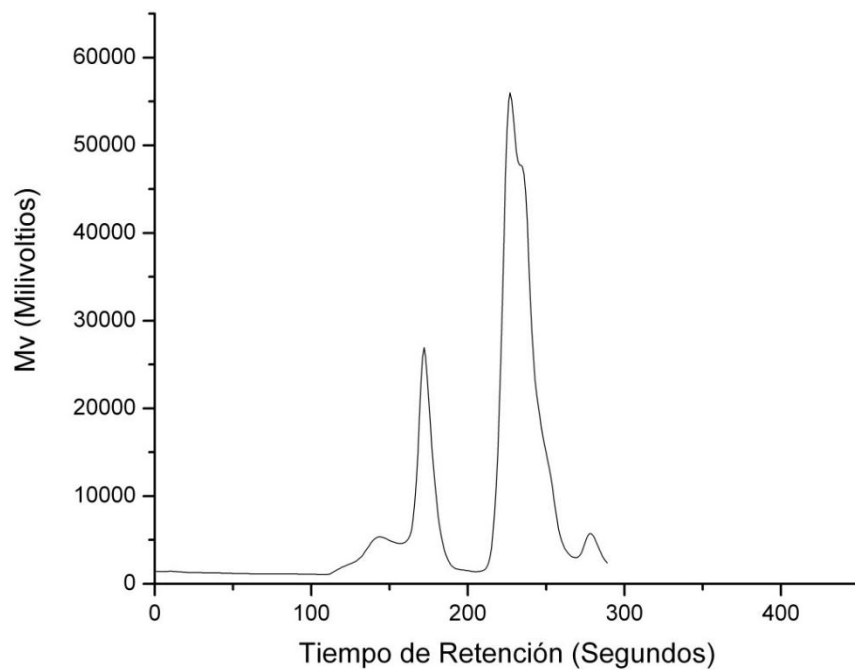


Figura18. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 60:40, v/v y velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

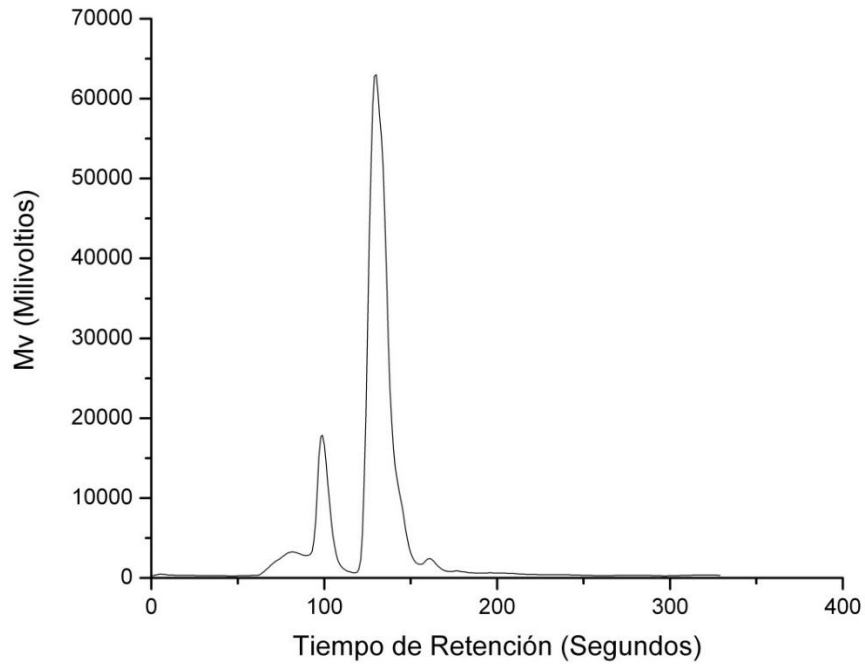


Figura 19. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, Fase Móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v y velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

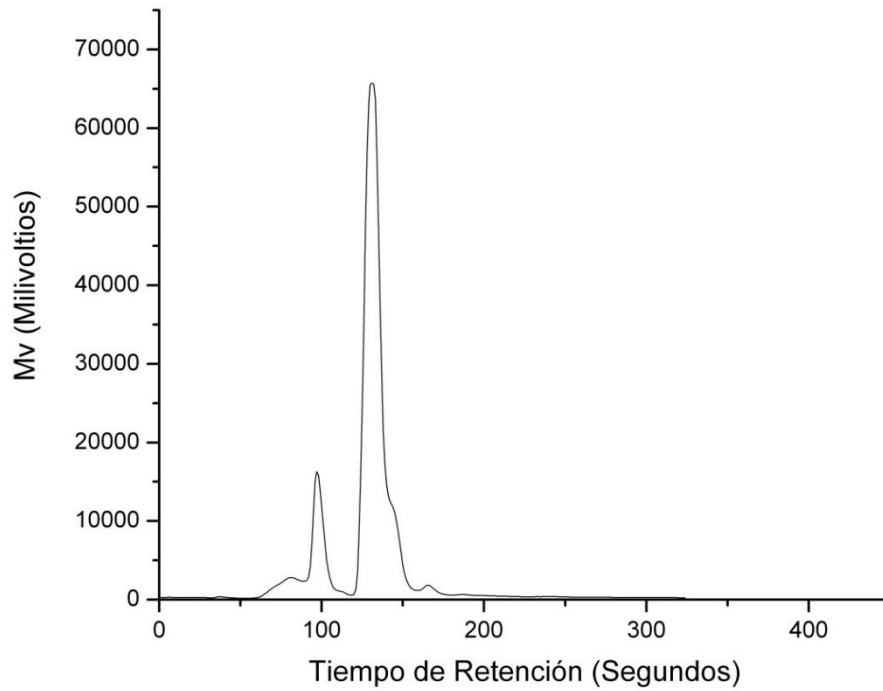


Figura 20. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 50:50, v/v y velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

3.3 EVALUACIÓN A DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO UTILIZANDO COMO FASE MOVIL AGUA MILLI-Q:ACN.

Con la finalidad de obtener una separación óptima de los componentes de las muestras de nejayote a diferentes valores de pH y tiempo de electrólisis se llevaron a cabo una serie de experimentos a diferentes velocidades de flujo. Las velocidades de flujo fueron realizadas desde 0.5 mL/min hasta 1.0 mL/min, aumentando de 0.1 mL/min en 0.1 mL/min la velocidad de flujo de la fase móvil Agua Milli-Q:ACN con un porcentaje 55:45 v/v constante para la muestra de nejayote tratada por electroxidación a un pH inicial = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h.

Las figuras de la 21 a la 26 se muestra los cromatogramas obtenidos para cada una de las velocidades de flujo (0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 mL/min) utilizando como fase móvil Agua Milli-Q:ACN en una relación de 55:45 v/v.

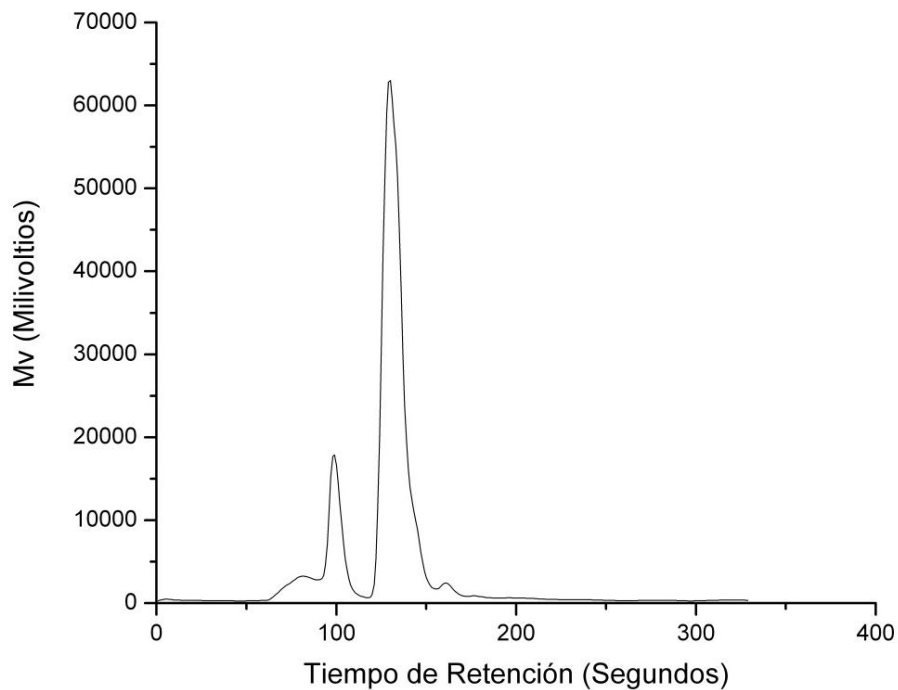


Figura 21. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

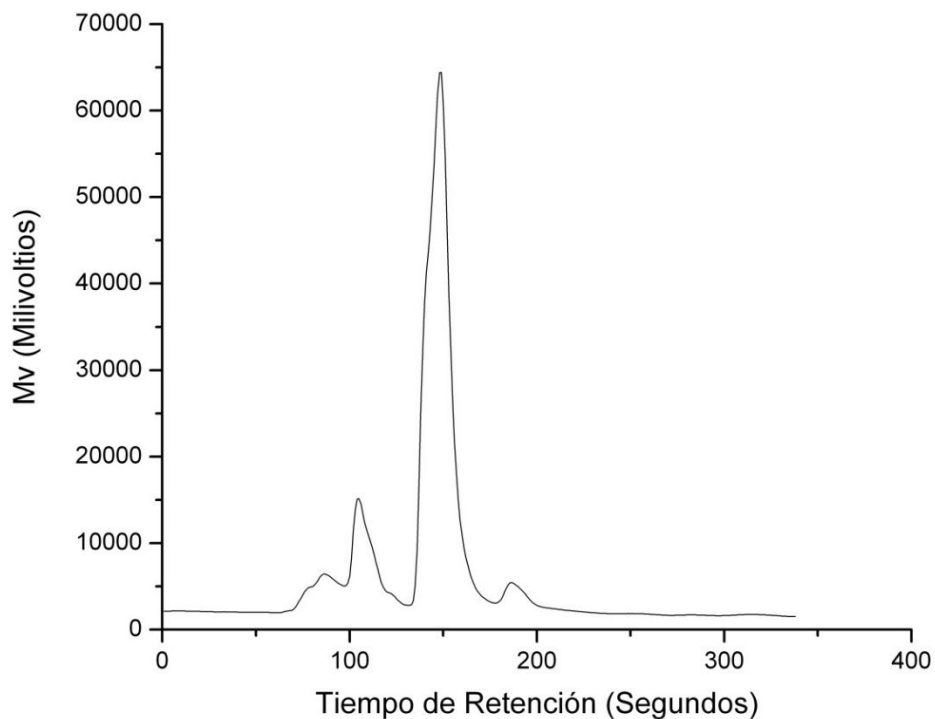


Figura 22. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.6 mL/min.

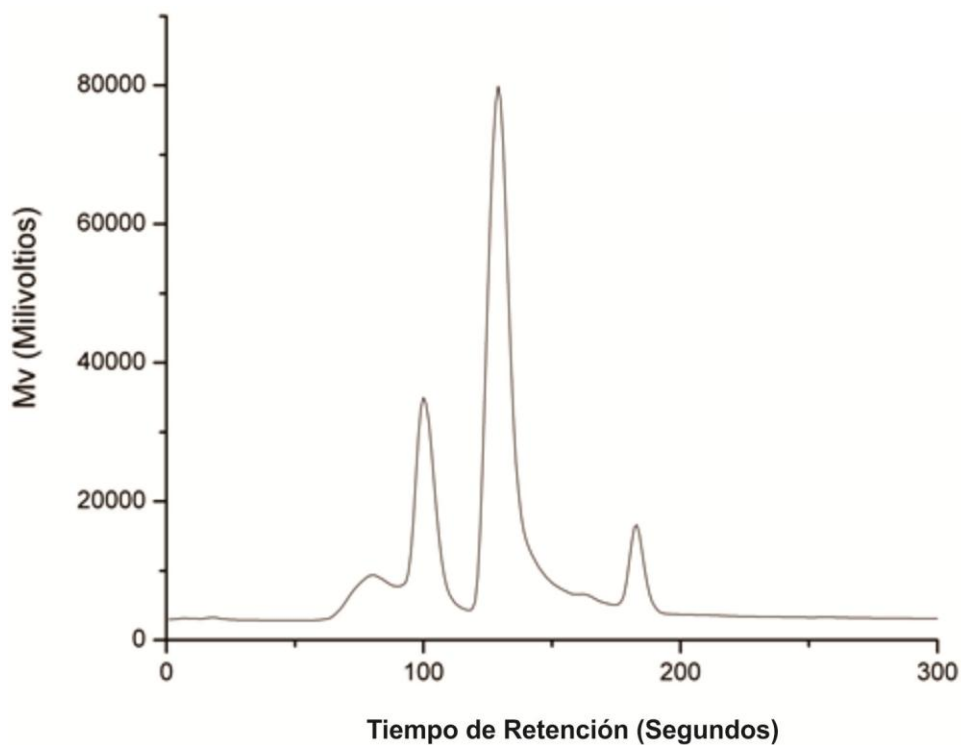


Figura 23. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

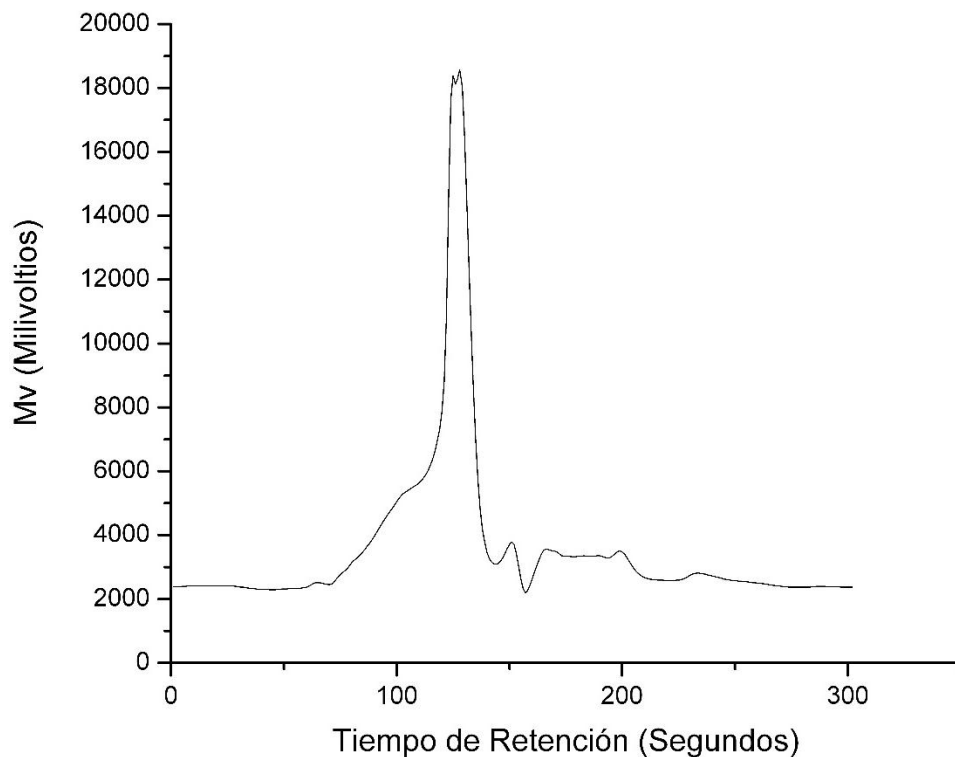


Figura 24. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min.

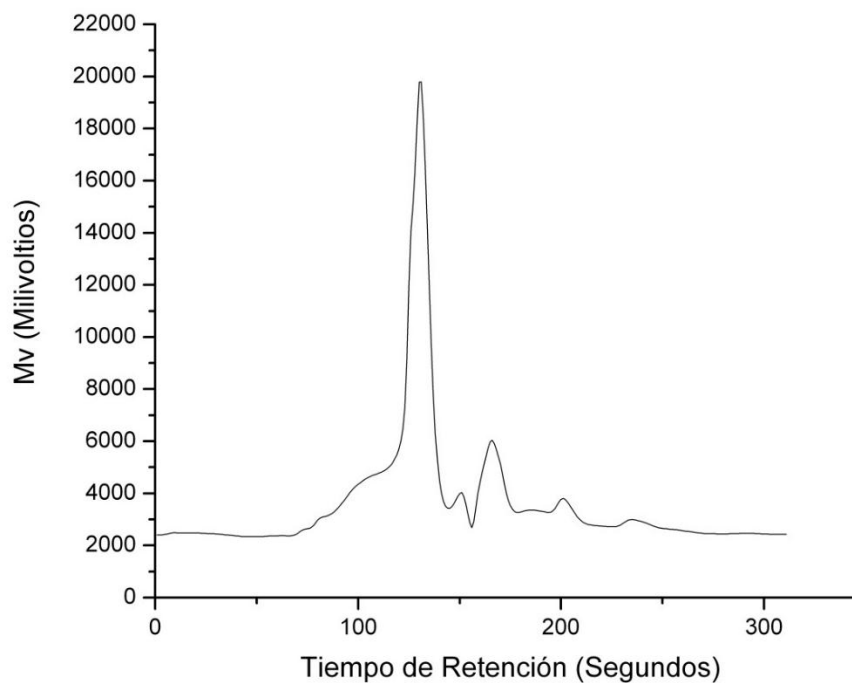


Figura 25. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 0.9 mL/min.

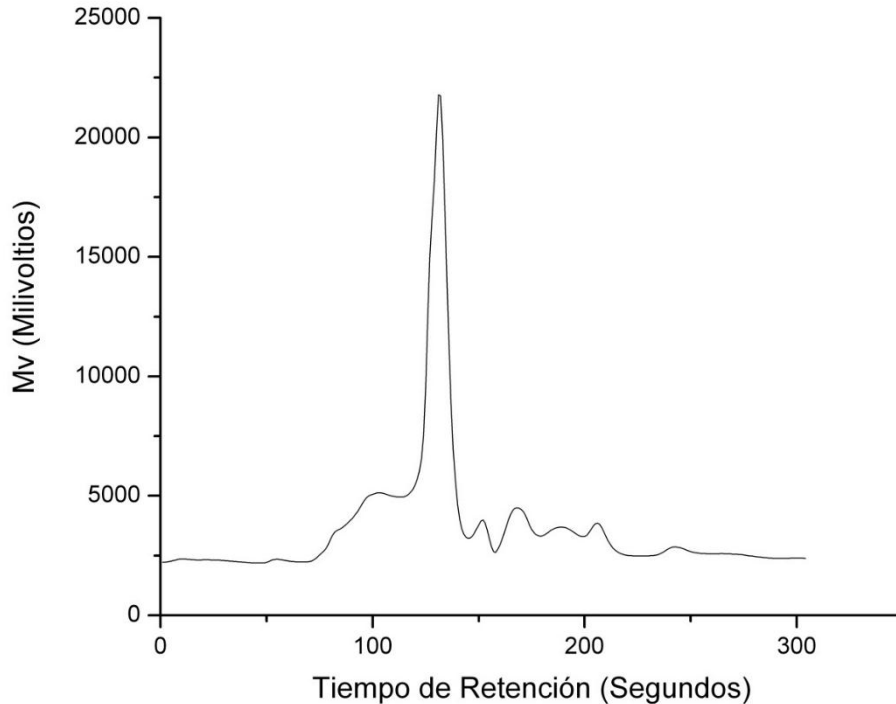


Figura 26. Cromatograma de la muestra de nejayote a un pH = 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, fase móvil agua Milli-Q: ACN 55:45, v/v con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

Analizando los cromatogramas correspondientes a las figuras 21-26 podemos sugerir que la separación de los compuestos presentes en la muestra de nejayote tratado por electroxidación a un pH inicial de 5 y tiempo de electrólisis de 2.00 h, es el cromatograma de la figura 21 y cuya velocidad de flujo de la fase móvil es igual a 0.7 mL/min. Puesto que se observan la separación de cuatro picos a diferentes tiempos de retención.

3.4 CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DE NEJAYOTE TRATADO POR ELECTROXIDACIÓN A DIFERENTES VALORES DE pH.

Se obtuvieron cada uno de los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por electroxidación considerando el efecto del pH inicial de 3, 5, 7, 9, 12.

De las Figuras 29 a la 31 se presentan los cromatogramas de las muestras de nejayote para cada uno de los pH iniciales de 3, 5, 7, 9, 12, con una fase móvil de Agua Milli Q:ACN 55:45 (v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min. Y las Tablas de la 4 a la 9 informan del número de picos, % de área, área de cada pico expresada en Milivoltios/segundo (mV/seg) y t_R de cada uno de los cromatogramas obtenidos, información recabada por el equipo de HPLC.

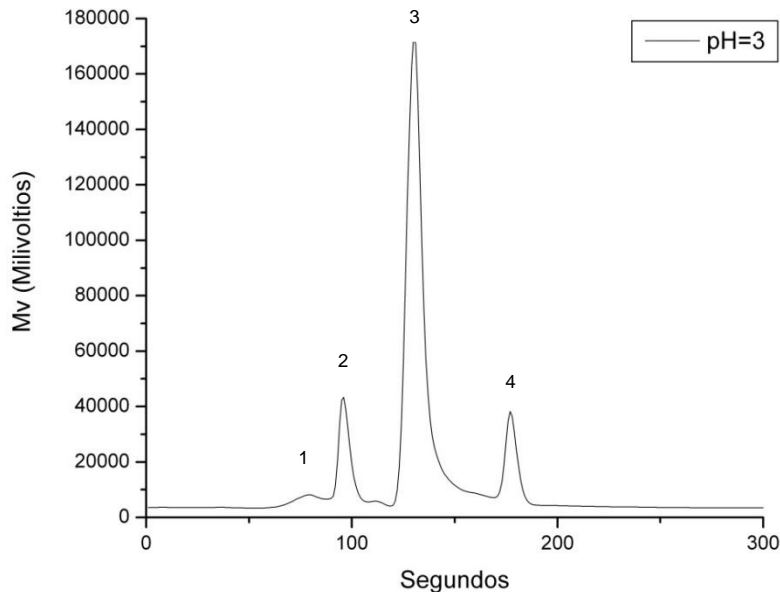


Figura 27. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 3.0, fase móvil Agua:Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Tabla 4. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=3.0.

Picos (número)	(% de área)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	3.16	77686.65	1.319
2	11.76	288551.12	1.595
3	72.05	1778052.91	2.171
4	12.06	297508.33	2.953

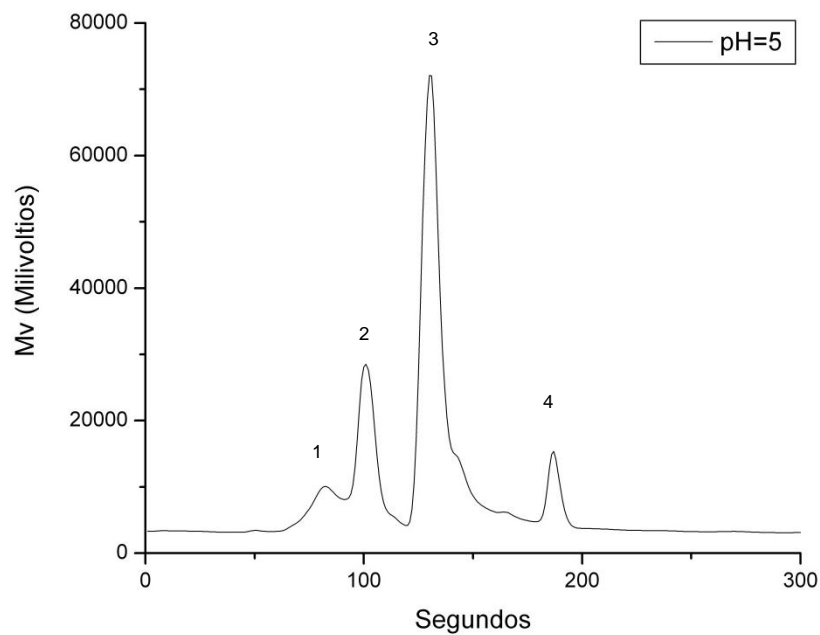


Figura 28. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 5.0, fase móvil Agua:Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Tabla 5. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=5.0.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	8.25	113565.67	1.372
2	19.96	274705.77	1.681
3	59.41	817550.07	2.174
4	8.33	114573.22	3.144

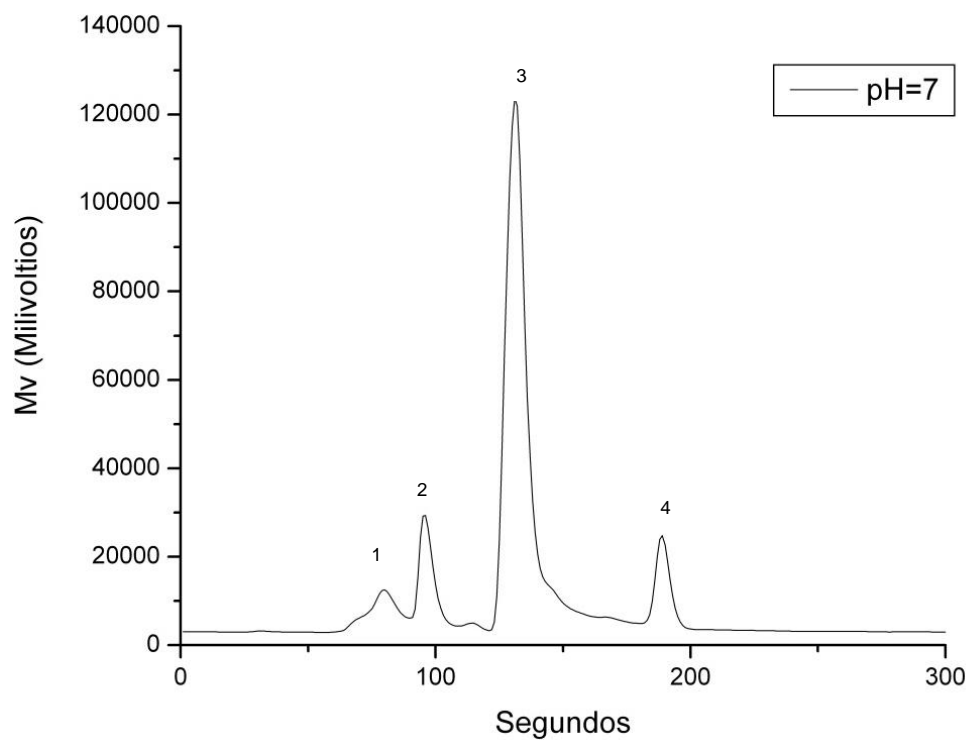


Figura 29. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 7.0, fase móvil Agua:Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Tabla 6. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=7.0.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	7.26	122790.87	1.330
2	10.45	192564.45	1.592
3	68	1253181.99	2.188
4	6.83	121003.21	3.153

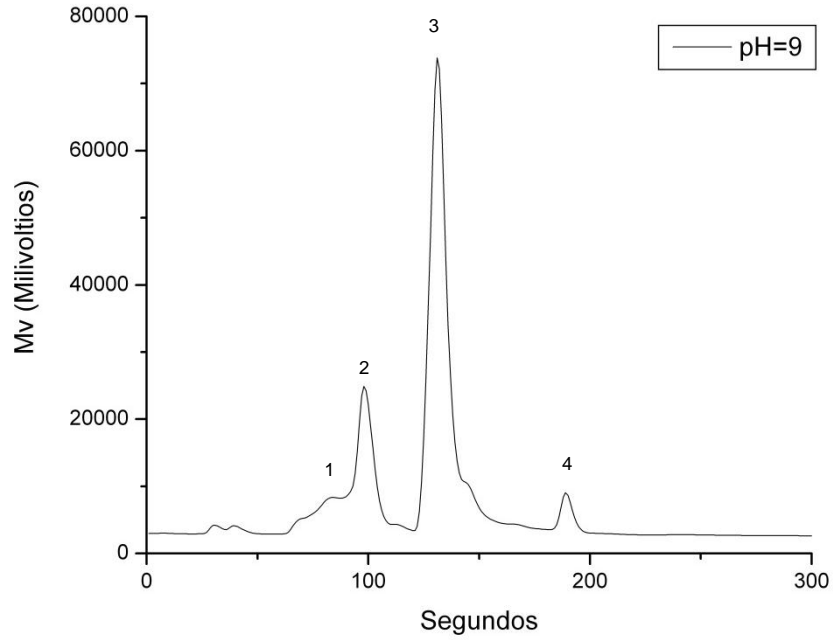


Figura 30. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 9.0, fase móvil Agua:Acetonitrilo (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Tabla 7. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH=9.0.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	7.10	71547.35	1.402
2	19.32	194668.16	1.637
3	69	695266.00	2.187
4	2.04	20588.47	3.153

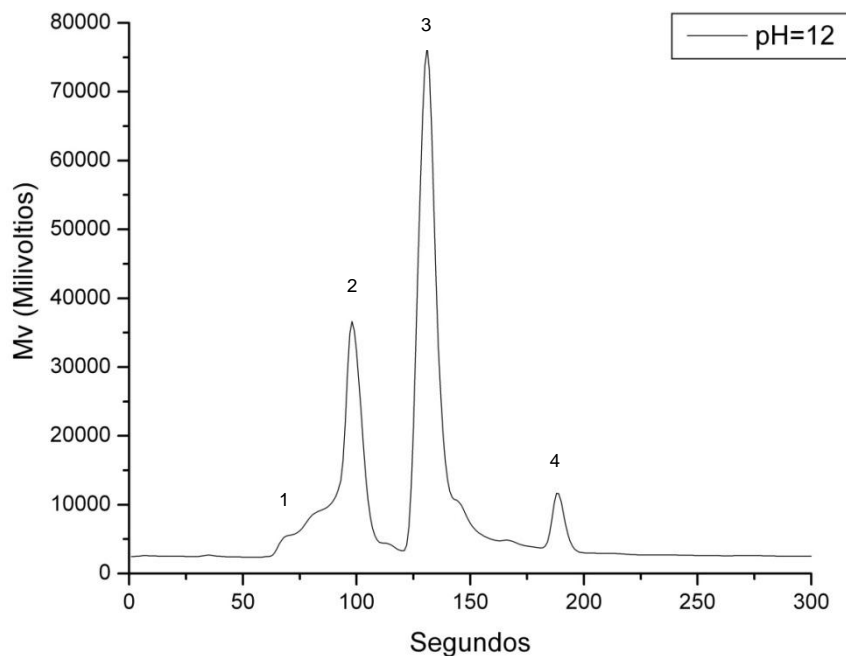


Figura 31. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12.0, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Tabla 8. Resultados obtenidos a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min para una muestra de nejayote tratada a pH = 12.0.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t _R (min)
1	1.67	21570.00	2.052
2	31.28	404704.01	1.627
3	52.22	675897.38	2.218
4	6.55	84849.67	4.136

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente para cada una de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a pH= 3, 5, 7, 9, 12, se observó la separación de los componentes corresponden a cuatro picos bien definidos a diferentes tiempos de retención. También se observó que en todos los casos de los diferentes valores de pH inicial, el pico número 3 presentó una mayor área y fue superior al 50% del área total de los picos. Es claro que el cromatograma de la figura 27 que corresponde a la muestra de nejayote a pH = 7, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de 0.7 mL/min., muestra una mejor separación de los cuatro

picos y el porcentaje de área del pico 3 es del orden de 68 % y de 7,26, 10.25 y 6.83 % los picos 1, 2 y 4, respectivamente.

Es importante señalar que todos los cromatogramas a diferentes valores de pH inicial presentaron 7 picos en su totalidad, sin embargo 3 picos fueron despreciados debido a que sus % de área eran por debajo del 0.09 del área total.

En la figura 32 se muestra una comparación de todos cromatogramas de nejayote tratado por oxidación anódica a pH diferentes y $T_e = 2.00$ h, en donde se observa que el pico número 3 correspondientes al pH = 3, 7 y 9, presentan un porcentaje de área de 72.05 % (1778052.91 mV/min), 68% (1253181.99 mV/min) y 69 % (695266.00 mV/min) respectivamente, mientras que los pH correspondientes a 5 y 12 corresponden al 59.41 % (817550.07 mV/min) y 52.22 % (675897.38 mV/min).

Por lo tanto, se puede sugerir que el efecto del pH inicial en las muestras de nejayote tratadas por el proceso de oxidación anódica con pH=5 y 12, muestran picos de menor intensidad y menores porcentajes de área, lo cual se sugiere que las muestras tratadas a valores de pH 5 y 12 se lleva a cabo una mayor remoción de contaminantes en comparación de la muestra tratadas a valores de pH = 3, 7 y 9.

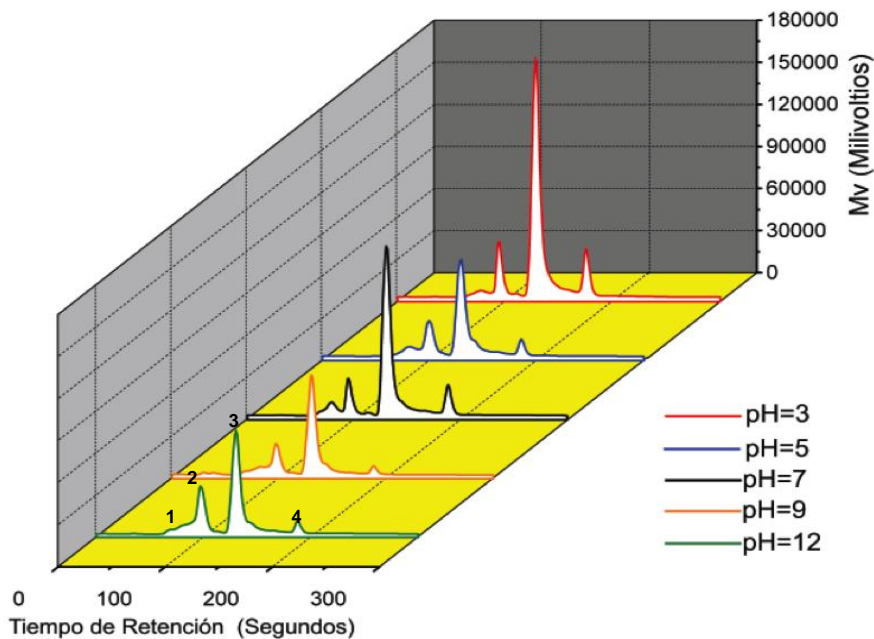


Figura 32. Comparación de los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a diferentes valores de pH inicial.

3.5 CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DE NEJAYOTE TRATADO POR ELECTROXIDACIÓN A DIFERENTES TIEMPOS DE ELECTRÓLISIS.

Se obtuvieron los cromatogramas de las muestras de nejayote tratada por oxidación anódica a los diferentes tiempos de electrólisis de 2.00, 2.15, 2.30, 2.45 y 3.00 h a pH constante de 12, a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min, y una fase móvil compuesta por Agua MilliQ:ACN en una relación de 55:45 (v/v).

En las figuras 33 a la 37 se presentan los cromatogramas a diferentes tiempos de electrólisis (2.00, 2.15, 2.30, 2.45 y 3.00 h), en donde se observó la separación de cinco picos a diferentes tiempos de retención y en las tablas 9-13, se informa del número, % de áreas, área de cada uno de los picos y los tiempos de retención. Además presentaron dos picos sobresalientes de áreas arriba del 40% del área total de los picos. Los diferentes cromatogramas presentaron cerca de 7 picos en su totalidad pero algunos se despreciaron debido a que sus porcentajes (%) de área fueron por debajo del 0.09 del área total.

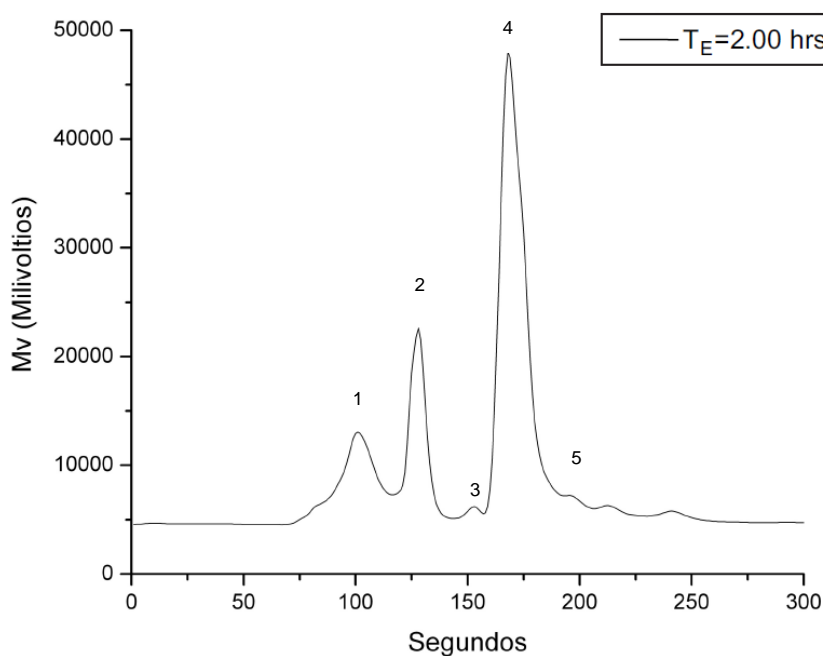


Figura 33. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 2.00$ h, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.

Tabla 9. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_E = 2.00$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	15.03	103584.21	1.684
2	18.58	159861.55	2.132
3	0.56	4806.00	2.548
4	61.07	525328.00	2.805
5	0.42	3592.00	3.542

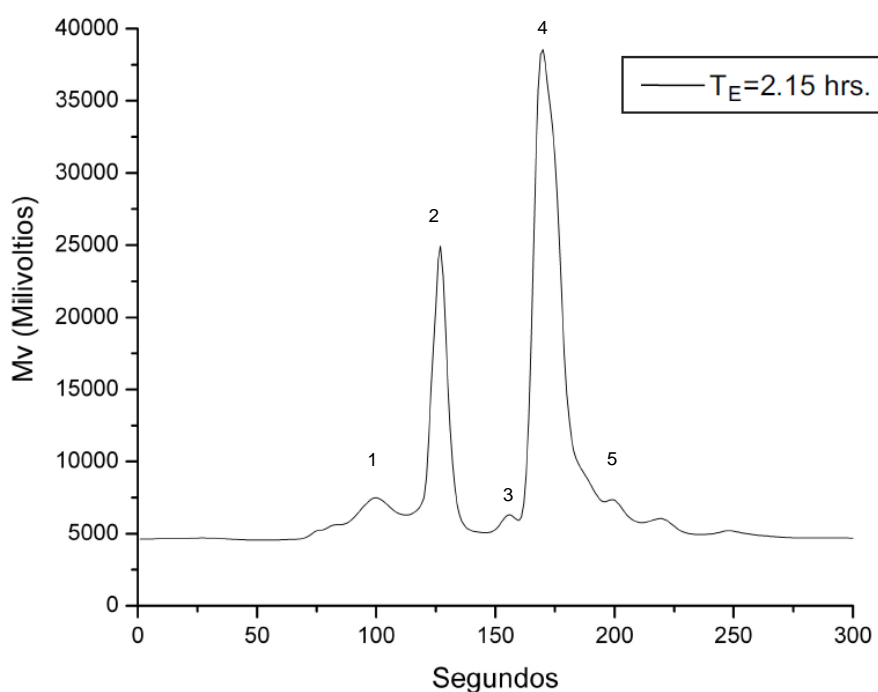


Figura 34. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_e = 2.15$ h, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.

Tabla 10. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_E = 2.15$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	8.48	68464.26	1.663
2	22.25	129559.62	2.113

3	2.00	16119.47	2.598
4	59.40	4794411.72	2.829
5	3.52	28449.00	3.316

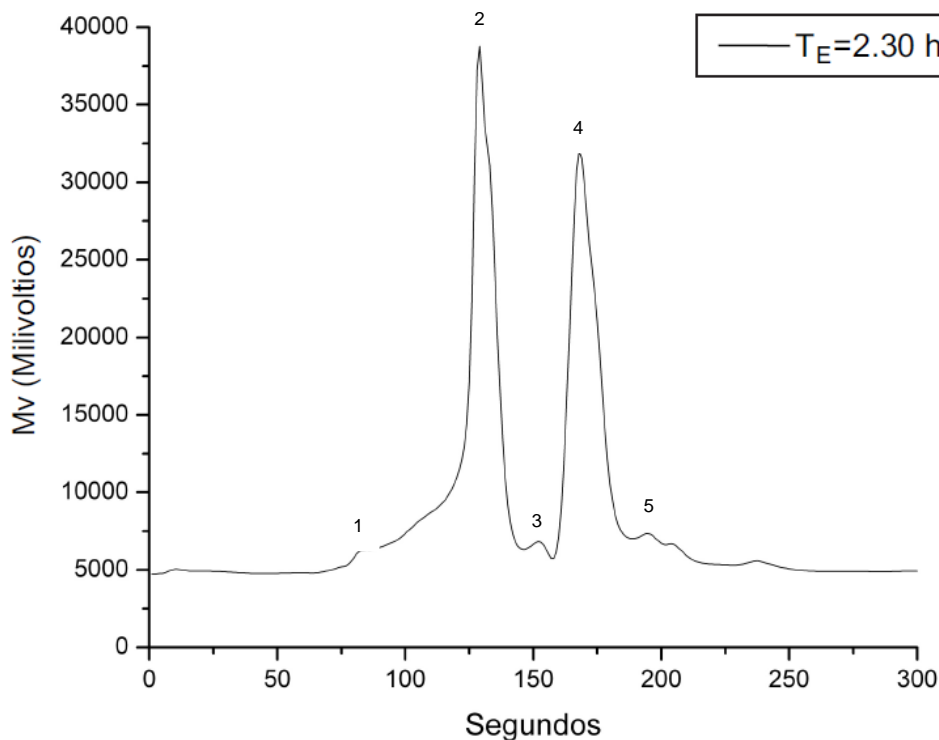


Figura 35. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_E = 2.30$ h, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.

Tabla 11. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_E = 2.30$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	1.99	15347.48	1.370
2	52.27	403875.00	2.130
3	1.03	7975.62	2.582
4	42.93	331653.19	2.813
5	0.61	4695.00	3.317

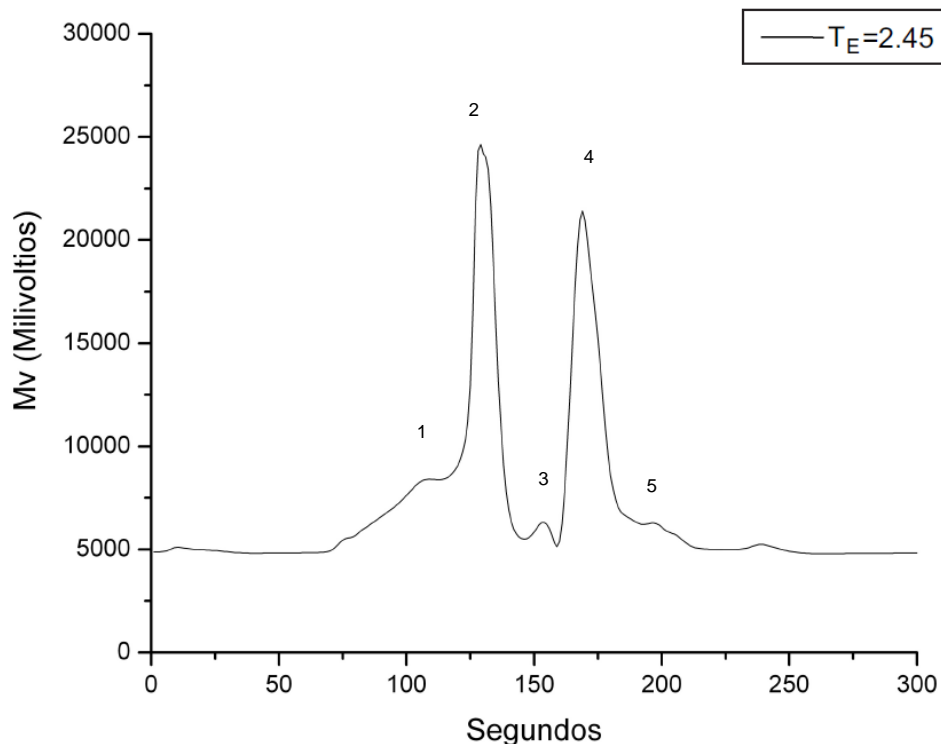


Figura 36. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_E = 2.45$ h, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.

Tabla 12. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_E = 2.45$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	14.34	88643.75	1.814
2	41.19	254600.88	2.148
3	2.02	12455.00	2.559
4	36.13	223336.27	2.816
5	3.95	24443.00	3.277

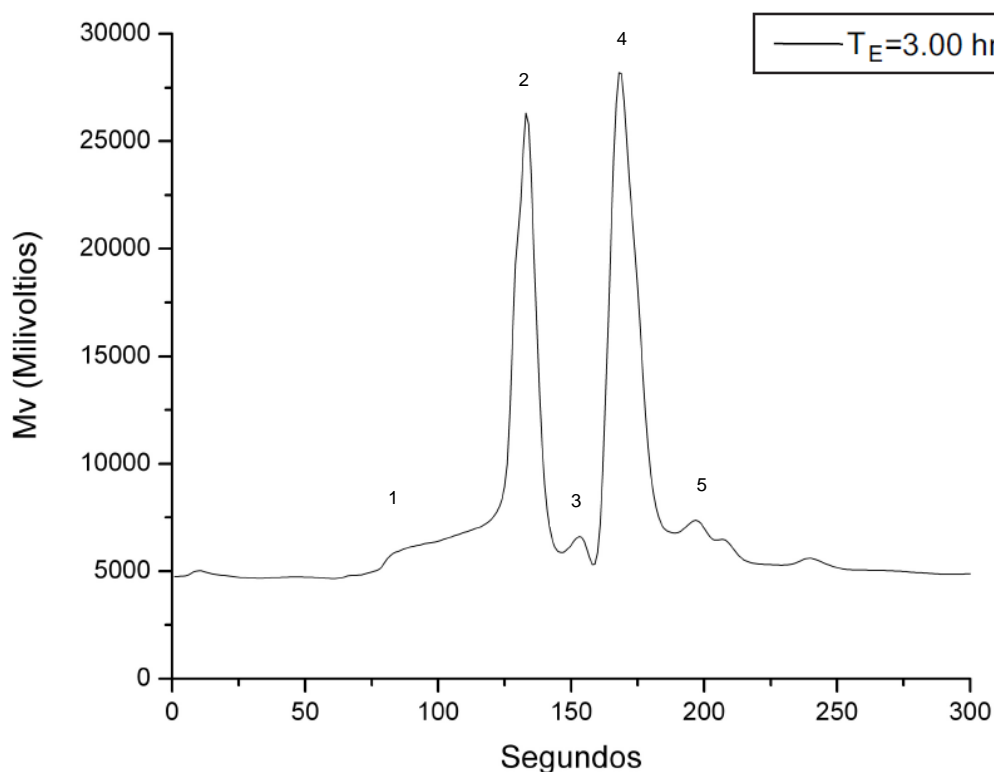


Figura 37. Cromatograma de la muestra de nejayote a pH = 12 y $T_E = 3.00$ h, fase móvil Agua Milli-Q: ACN (55:45, v/v) y velocidad de flujo de fase móvil de 0.7 mL/min.

Tabla 13. Resultados obtenidos para una muestra de nejayote tratada a pH=12 y $T_E = 3.00$ h a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Pico (número)	Área (%)	Área (mV·sec)	t_R (min)
1	0.170	3041.00	0.52
2	46.91	274341.00	2.221
3	1.57	1302.13	2.553
4	48.51	283704.00	2.808
5	1.64	9597.00	3.280

En la figura 36 se presenta la comparación de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a diferentes tiempos de electrólisis y un pH=12, en donde se muestra que los picos número 2 y 4 presentan mayor área que el resto de los picos en su conjunto. Los cromatogramas correspondientes a los $T_E=2.00$, 2.15 h. y 3.00 h,

presentan un pico de mayor porcentaje de área de 61.07 % (525328 mV.sec), 59.40 % (4794411 mV.sec) y 48.51 % (283704.00 mV.sec). Los para los tiempos de electrólisis de 2.30 y 3.00 h, el mayor porcentaje de área del pico número 2 fue de (52.27% 403875 mV.sec) y (41.19%, 254600 mV.sec) respectivamente.

Al observar la Figura 38 se puede sugerir que hay mayor remoción de contaminantes en tiempos de electrólisis mayores, es decir la muestra tratada a un $T_E = 2.45$ y 3.00 h a $pH=12$.

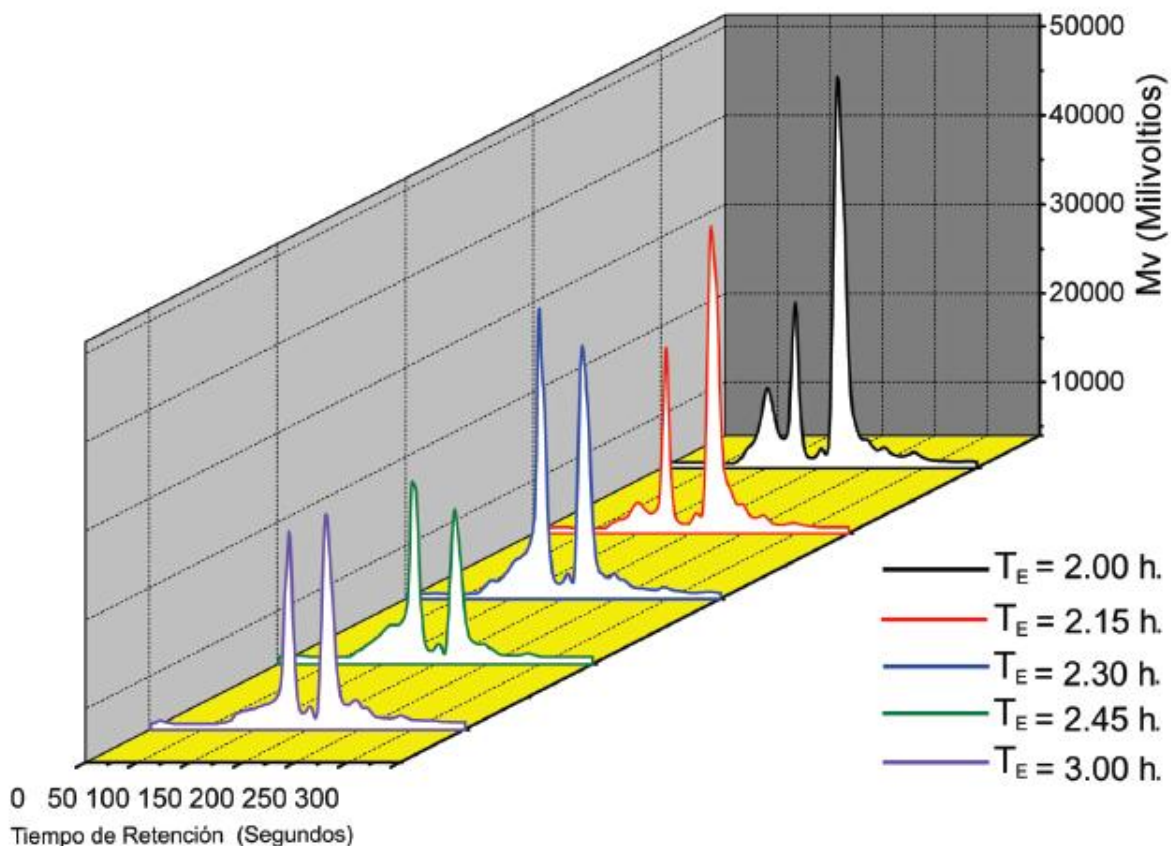


Figura 38. Comparación de los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a diferentes tiempos de electrólisis.

A continuación en la tabla 14 se resumen el número de picos, el tiempo de electrólisis y las áreas expresadas en mV/min, en donde se observa los mayores porcentajes de área de los cinco presentes en los cromatogramas (picos 4 y 2).

Tabla 14. Porcentajes del área de cada pico de los cromatogramas obtenidos de la serie de tiempo de electrolisis.

Número de pico t _e (hrs.)	2.0	2.15	2.30	2.45	3.00
1	15.03	8.48	1.99	14.34	0.170
2	18.58	22.25	52.27	41.19	46.91
3	0.56	2.00	1.03	2.02	1.57
4	61.07	59.40	42.93	36.13	48.51
5	0.42	3.52	0.61	3.95	1.64

Algunas observaciones durante la validación del método en las muestras de nejayote tratado por electroxidación en el equipo de HPLC fueron las siguientes:

- ❖ Cuando la fase móvil fue agua Milli Q:ACN, 5:95, v/v, es decir un mayor porcentaje de ACN, solo se observa un solo un pico bien definido.
- ❖ Cuando se aumenta la velocidad de flujo (mayor a 0.7 mL/min hasta 1 mL/min), los picos se definen mejor pero el pico de mayor área sufre un ensanchamiento y por lo tanto desaparecen la mayoría de picos.
- ❖ Cuando se aumentó el porcentaje de agua en la fase móvil, es decir, agua:ACN, 95:5, v/v, desaparece el pico de mayor intensidad y solo se obtiene un cromatograma con picos muy pequeños, pero no definidos.

CONCLUSIONES

De acuerdo al trabajo experimental realizado se concluye:

- ❖ Las condiciones experimentales consideradas como óptimas para la separación de compuestos en muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica tanto para pH como para los tiempo de electrólisis utilizando una columna de fase reversa, un detector a una longitud de onda de 254 nm, fueron: una fase móvil de Agua Milli-Q: ACN 55:45 (v/v) y una velocidad de flujo de fase móvil igual 0.7 mL/min.
- ❖ Tanto en las muestras de nejayote tratado a diferentes valores de pH como a diferentes tiempo de electrólisis, los cromatogramas presentaron un total de 7 compuestos, de los cuales 2 compuestos presentaron una mayor intensidad y por tanto, un mayor porcentaje de área en los cromatogramas.
- ❖ De acuerdo a los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica a pH iniciales de 5 y 12, mostraron menores intensidades y porcentajes de área, lo cual sugiere que hay una mayor remoción de contaminantes o compuestos presentes en nejayote.
- ❖ De acuerdo a los cromatogramas de las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica diferentes tiempos de electrólisis 2.45 y 3.00 h, mostraron menores intensidades y porcentajes de área, lo cual sugiere que hay una mayor remoción de contaminantes o compuestos presentes en nejayote.
- ❖ Fue posible utilizar la técnica por HPLC para determinar los componentes presentes en las muestras de nejayote tratadas por oxidación anódica por efecto de pH y tiempo de electrólisis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pérez, G, P. (2013). *Estudio de coagulación química y electrocoagulación de nejayote empleando un electrodo de aluminio como ánodo*. Tesis de licenciatura. Benemérita universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Puebla, México.
2. Rodríguez, A; Letón, P.; Rosal, R.; Dorado, M; Villar, S. y Sanz, J. M. (2006). *Informe de vigilancia tecnológica, Tratamientos Avanzados de Aguas Residuales Industriales*. CITME. Universidad de Alcalá.
3. Sanz, J. (2011). *Alternativas operacionales en tecnologías de oxidación avanzada para el tratamiento de efluentes de alta carga contaminante*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. Lejona, España.
4. Carabias, J., Landa R.; Collado J. y Martínez P. (2005). *Agua, Medio Ambiente y Sociedad. Hacia la gestión integral de los recursos hídricos en México*. Revisado el 2 de Septiembre de 2014 en:
http://www.bibliotecavirtual.info/recursos/agua_medio_ambiente_y_sociedad.pdf
5. Riveiro, S. 2004. El día en que muera el sol: contaminación y resistencia en México. GRAIN
6. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos. Revisado el 18 Junio de 2014: www.sagarpa.gob.mx
7. Paredes, O.; Guevara, F. y Bello, L. A. (2008). *La Nixtamalización y el valor nutritivo del maíz*. Ciencias 92-93. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.
8. Domínguez, E. R. y Pacho, C. D. (2003). *Efluentes de la industrialización del maíz: ¿contaminante o recurso valioso?* Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán. Número 227. 54-63 pp.
9. García, G. C.; Gortáres, M. P. y Drogui, P. (2011) *Tratamientos biológicos y de oxidación avanzada combinados para una solución a la biotecnología ambiental*. Ide@s CONCYTEC. Número 6 (71). 585-605 pp.
10. Urkiaga, G. A.; Gómez, R. L.; Gutiérrez, R. M.; Fuentes, I. L. *Aplicación de procesos de oxidación avanzada al tratamiento de efluentes de diferentes sectores industriales*. GAIKER Centro Tecnológico.
11. Rajeshwar, J.; Ibanez, J. G. y Swain, G. M. (1994). *Reviews of electrochemistry. Electrochemistry and the environment*. Journal of Applied Electrochemistry. Volumen 24 (N° 11). 1077-1091 pp.

12. Téllez P. V. (2013). *Efluente del proceso de nixtamalización tratado por coagulación química y oxidación anódica*. Tesis de licenciatura no publicada. Benemérita universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Puebla, México.
13. Méndez, A. (2010). *Coagulación química y oxidación electroquímica para la eliminación de un colorante textil en solución acuosa*. Tesis de Licenciatura no publicada. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Puebla, México.
14. Wang, Y.H.; Chen Q.Y.; Li Guo y Li Xiang-Lin (2012). *Anodic Materials with High Energy Efficiency for Electrochemical Oxidation of Toxic Organics in Waste Water*. Industrial Wastewater. Capítulo 2. 33-52 pp.
15. Amaro, R.; Murillo, M.; Escalona, A.; Lucena, R. y Verdú, R. (2005). *Seguimiento del Proceso de Conversión y Eliminación del Cr (VI) y Cr(III) en las Aguas de una Industrial de Cromado por HPLC-ICP-OES*. Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences at La Universidad del Zulia: 13(1), 78-84 pp.
16. Kromidas, S. (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim. Federal Republic of Germany. 269 pp.
17. Esquivel S. E. y Leal G. L. (2004). *Cromatografía de Fase Reversa*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.
18. Skoog D. A.; Holler J. F.; Nieman A. T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. España: Mc Graw Hill.
19. Esquivel, S. E.E. y Leal, G. L. I. (2004). *Cromatografía de fase reversa*. Trabajo de investigación. UNAM. México.
20. Dawson, V.K., J.R. Meinertz, L.J. Schmidt y W.H. Gingerich; (2003). *A Simple Analytical Procedure to Replace HPLC for Monitoring Treatment Concentrations of Chloramine-T on Fish Culture Facilities*. *Aquaculture*: 217(1-4), 61-72 pp.
21. Zhou, J.Y.; P. Prognon; C. Dauphin, y M. Hamon. (1994). *HPLC Fluorescence Determination of Nitrites in Water Using Precolumn Derivatization with 4-methyl-7-aminocoumarin*. *Chromatographia*. 36(1). 1612-1112 pp.
22. Sarno, M. y Delfino M. (2001). *Fenoles y Derivados por HPLC-SPE*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE). Argentina
23. Acción ecológica (2004). Revisado el 20 de mayo de 2014:
http://elmaiznuestropatrimonio.files.wordpress.com/2012/05/maiz_-de-alimento-sagrado-a-negocio-del-hambre.pdf
24. Red latinoamericana de Química (2000) Revisado el 13 de agosto de 2014:
<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.htm>

25. Grace Company (2004). Alltech Chromatography: Columns, Instruments, Accessories. E.U.

26. Sacristán, S.C. M., Díaz, P. E. M., Alarcón, A. B., Vicente, C. C., Legaz, G. M. E. (2011) *Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil.* Universidad Complutense de Madrid. España.