

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS CONTENIDOS EN  
LAS AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DEL PROCESO DE  
EXTRACCION DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA**

**Qca. YANETH QUINTERO LOPEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
MAESTRIA EN QUIMICA  
BUCARAMANGA  
2014**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS CONTENIDOS EN  
LAS AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DEL PROCESO DE  
EXTRACCION DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA**

**YANETH QUINTERO LOPEZ**

**Quimica**

**Trabajo de Grado para optar al título de  
Master en Química**

**Director**

**MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTAÑEZ**

**Química Ph.D.**

**Codirigido por:**

**HELI MENESES**

**Ing. Químico.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**MAESTRIA EN QUIMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## DEDICATORIA

*La presente Tesis está dedicada a Dios, ya que gracias a él he logrado un nuevo sueño, a mi madre Carmen porque ella ha dado razón a mi vida, por sus consejos, su apoyo incondicional y su paciencia, todo lo que hoy soy es gracias a ella, a mi esposo Julio Calvo con todo mi amor y cariño por sus palabras, su confianza y su amor, sin él los momentos difíciles no hubiesen sido llevaderos, a mis amados hijos Julio Andrés y Daniel Felipe, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor, a mi hermano y mi cuñada por sus palabras y su compañía, a mis sobrinitos Karen y Juan David por su inmenso amor y a mis amigos, compañeros, y todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido para el logro de mis objetivos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento muy especial al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales – CEIAM-UIS por su gran apoyo económico en este estudio, a la Dra. Marianny Yajaira Combariza por ser mi guía y consejera, a Ángela María Vásquez C. por su gran apoyo técnico incondicional y a mis compañeras de trabajo Patricia y Paola por su amistad y colaboración.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>1. ESTADO DEL ARTE</b>	19
1.1. Sector palmero en Colombia	19
1.1.1 Proceso de extracción del aceite de palma	20
1.1.2 Aguas residuales del proceso de extracción de aceite de palma africana, composición y utilización	22
1.2 Los compuestos fenólicos	26
1.2.1 Métodos de cuantificación e identificación de fenoles	28
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	34
2.1 Materiales y reactivos	34
2.1.1 Reactivos	34
2.1.2 Equipos y materiales de laboratorio	35
2.2 Muestras	35
2.3 Determinación del contenido de fenoles totales	37
2.3.1 Método colorimétrico 5530 B-D S. M. edición 22 del 2012	37
2.3.2 Ensayo Folin- Ciocalteau: Técnica descrita por Wollgast 2004	38
2.4 Identificación y cuantificación del contenido fenólico presente en el efluente molido del aceite de palma (POME) o agua residual del proceso de extracción del aceite de palma africana	39
2.4.1 Determinación por cromatografía de gases acoplada a masas	39
2.4.1.1 Composición química del POME (Cantidad relativa, % e identificación tentativa)	39
2.4.1.2 Determinación del contenido de fenoles por cromatografía de gases acoplada a masas, en los puntos entrada a la PTAR y salida	

de las facultativas	40
2.4.2 Determinación por HPLC acoplada a masas	40
2.4.2.1 Preparación de la muestra para el análisis	40
2.4.2.1.1 Eliminación de grasas	40
2.4.2.1.2 Extracción del contenido de fenoles	40
2.4.2.1.3 Eliminación de impurezas	40
2.4.2.2 Determinación y cuantificación	41
2.4.2.3 Figuras analíticas de mérito	41
2.4.2.3.1 Linealidad y sensibilidad del método	42
2.4.2.3.2 Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)	42
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
3.1 Determinación del contenido de fenoles totales	43
3.1.1 Método colorimétrico 5530 B_D del Standard Methods edición 22 del 2012	43
3.1.1.1 Curva de calibración	43
3.1.1.2 Análisis de muestras	45
3.1.1.2.1 Primer monitoreo	45
3.1.1.2.2 Segundo monitoreo	45
3.1.2 Ensayo Folin-Ciocalteu	46
3.1.2.1 Curva de calibración	46
3.1.2.2 Análisis de muestras	48
3.1.2.2.1 Primer monitoreo	48
3.1.2.2.2 Segundo monitoreo	49
3.2 Identificación y cuantificación del contenido de fenoles totales	50
3.2.1 Determinación por cromatografía acoplada a masas	50
3.2.1.1 Composición química del POME	50
3.2.1.2 Determinación del contenido de fenoles a la entrada de la PTAR y a la salida de las facultativas	52

3.2.2	Determinación por HPLC MS/MS	54
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>66</b>
4.1	Determinación del contenido de fenoles totales	66
4.2	Identificación y cuantificación del contenido de fenoles totales presentes en las aguas residuales de los procesos de extracción del aceite de palma africana	67
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES.</b>	<b>74</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de extracción del aceite de Palma Africana	20
<b>Figura 2.</b> Generación de residuos en el proceso de extracción de Aceite de palma	23
<b>Figura 3.</b> Cromatografía en fase reversa	30
<b>Figura 4.</b> Ionización electrospray	33
<b>Figura 5.</b> Esquema de un analizador de trampa de iones	34
<b>Figura 6.</b> Proceso de extracción del aceite de palma africana y puntos de toma de muestra de las aguas residuales	36
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración método colorimétrico 5530 B-D S. M	44
<b>Figura 8.</b> Comparación de la concentración de fenoles totales (primer y Segundo monitoreo) método colorimétrico 5530 B-D del S. M	46
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración ensayo Folin – Ciocalteau	48
<b>Figura 10.</b> Comparación de la concentración de fenoles totales (primer y Segundo monitoreo) ensayo Folin – Ciocalteau	50
<b>Figura 11.</b> Cromatograma datos identificación tentativa por GC-MS	51
<b>Figura 12.</b> Cromatograma patrón de 5 µg/mL de fenoles	52
<b>Figura 13.</b> Determinación de los fenoles presentes en las aguas residuales del proceso de extracción del aceite de palma africana; A: Perfil cromatográfico de la muestra entrada PTAR; B: Perfil cromatográfico de la muestra salida facultativas	53
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas de los patrones de fenoles por HPLC	56
<b>Figura 15.</b> Determinación del contenido fenólico en las aguas residuales provenientes de las diferentes etapas del proceso de extracción del aceite de palma africana	60
<b>Figura 16.</b> Espectros de masas de los compuestos fenólicos identificados por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en los extractos de las aguas residuales del proceso.	64
<b>Figura 17.</b> Datos de fenoles obtenidos en las aguas residuales generadas	

a lo largo del proceso de extracción del aceite de palma africana. 69

## LISTA DE LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones para el control de la carga de sustancias de interés sanitario	25
<b>Tabla 2.</b> Datos curva de calibración método colorimétrico 55-30 B-D del Standard Methods edición 22 del 2012.	43
<b>Tabla 3.</b> Datos curva de Calibración Método colorimétrico 5530 B-D S.M (límites de detección)	44
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones de fenoles totales en muestras (método 55-30 B-D del S. M. (Primer monitoreo)	45
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de fenoles totales en muestras (método 55-30 B-D del S. M. (segundo monitoreo)	45
<b>Tabla 6.</b> Datos curva de calibración ensayo Folin – Ciocaltau	47
<b>Tabla 7.</b> Datos curva de calibración ensayo Folin – Ciocaltau (límites de detección)	47
<b>Tabla 8.</b> Concentración de fenoles totales en muestras ensayo Folin – Ciocaltau. (Primer monitoreo)	49
<b>Tabla 9.</b> Concentración de fenoles totales en muestras ensayo Folin – Ciocaltau. (Segundo monitoreo)	49
<b>Tabla 10.</b> Datos identificación tentativa por GC – MS	51
<b>Tabla 11.</b> Resultados obtenidos de las muestras entrada PTAR y salida lagunas facultativas	53
<b>Tabla 12.</b> Condiciones de análisis por HPLC	55
<b>Tabla 13.</b> Condiciones de análisis por masas	55
<b>Tabla 14.</b> Datos curvas de calibración HPLC	56
<b>Tabla 15.</b> Fórmulas químicas de los compuestos fenólicos	57
<b>Tabla 16.</b> Tiempos de retención de los analitos	58
<b>Tabla 17.</b> Figuras analíticas de mérito para la metodología implementada	58
<b>Tabla 18.</b> Concentraciones de fenoles encontradas en las muestras por HPLC	62



## ABREVIATURAS

<b>PTAR</b>	planta de tratamiento de aguas residuales.
<b>S.M.</b>	standard Methods edición 22 de 2012.
<b>POME</b>	efluente molido del Aceite de palma o aguas residuales generadas del proceso de extracción del aceite de palma africana.
<b>LOD</b>	límite de detección del método.
<b>LOQ</b>	límite de cuantificación del método.
<b>FIA</b>	flow Injection Analysis.

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS CONTENIDOS EN LAS  
AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES DEL PROCESO DE EXTRACCION DEL ACEITE  
DE PALMA AFRICANA\***

**Yaneth Quintero López\*\***

**Palabras claves: PTAR, HPLC**

**RESUMEN**

Actualmente no se conocen las características químicas de los compuestos fenólicos provenientes del procesamiento del fruto de la palma africana para la extracción del aceite en Colombia. Por lo cual, se realizó un estudio de los efluentes acuosos provenientes de los diferentes procesos, en términos de concentración y composición de la fracción fenólica, con el fin de permitir diseñar estrategias a corto plazo, apropiadas para la remoción o el aprovechamiento de dichos compuestos. Este estudio se realizó a las aguas residuales generadas en las siguientes etapas del proceso de extracción del aceite de palma africana: Entrada PTAR y Salidas (Condensados, Centrifugas, Hidrociclón, lagunas anaerobias y facultativas). El estudio inició con la determinación de los fenoles totales mediante el método 5530 B-C del Standard Methods edición 22 del 2012 y mediante la técnica Fiolín- Ciocalteau, encontrándose concentraciones de fenol total superiores a los límites permisibles de vertimientos (0,2mg/L) en todas las etapas analizadas. Las mayores concentraciones fueron encontradas a la salida de los condensados (3,15 y 5,65 mg/L de fenol total método S. M), y a la salida de la centrifuga (3,84 y 4,78 mg/L de fenol total). En estas etapas no hay adición de reactivos que contengan o produzcan fenoles, lo que demuestra que los fenoles son proporcionados por el mismo fruto, así como lo confirmó el estudio de Yun-Ping y colaboradores. Posteriormente se realizó un análisis tentativo de los fenoles totales por GC-MS a la salida de los condensados, encontrándose la presencia mayoritaria de fenol (1,6%), también se analizó la presencia de clorofenoles por GC-MS en las aguas de condensados y a la entrada PTAR y salida facultativa, observándose ausencia en los compuestos analizados. Adicional a estos estudios, se identificaron y se cuantificaron los ácidos fenólicos (gálico, protocatechuic, salicílico, vanílico, cafeico, p-cumárico, ferúlico) y el fenol, mediante la técnica HPLC/MS.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ciencias: Escuela de Química. Directora: Dra. Marianny Yajaira Combariza,  
Química Ph.D.

## CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS CONTAINED IN WASTEWATERS FROM THE EXTRACTION PROCESS OF AFRICAN PALM OIL

López Quintero Yaneth

**Palabras claves:** PTAR, HPLC

### ABSTRACT

Currently no chemical characteristics of phenolic compounds from the processing of the fruit of the African palm oil extraction in Colombia are known. Therefore, a study of aqueous effluents from different processes, in terms of concentration and composition of the phenolic fraction was performed, in order to allow the design of short-term strategies appropriate for the removal or the use of such compounds. This study analyzed the wastewater generated in the following steps in the extraction process of oil palm: Liquid intake and outputs to WWTP (Condensates, Centrifuge, Hydro-cyclone, anaerobic and facultative pond). The study began with the determination of total phenols by the method of Standard Methods 5530 BC issue 22 of 2012 and by the fiolin - Ciocalteau technique, finding the total of phenol concentrations above the permissible limits of discharge ( 0.2 mg / L ) in all stages tested. The highest concentrations were found in the condensate outputs (3.15 and 5.65 mg / L total phenol method S. M), and at the outputs of the centrifuge ( 3.84 and 4.78 mg / L of phenol total). In these stages there are no addition of reagents that contain or produce phenols, demonstrating that phenols are provided by the same fruit, as was confirmed by the study of Yun -Ping et al. Subsequently, a tentative analysis of the total phenols at the outputs of the condensates was tested by GC- MS, discovering the major presence of phenol (1.6%). The presence of chlorophenols was also analyzed by GC - MS in the water condensate and WWTP input and optional output, showing absence in the analyzed compounds. In addition to these studies, we identified and quantified the phenolic acids (gallic , protocatechuic , salicylic , vanillic , caffeic acid, p -coumaric , ferulic) and the phenol using the HPLC / MS technique.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of Science: School of Chemistry. Director: Dra. Marianny Yajaira Combariza,  
Química Ph

## INTRODUCCION

Los efluentes acuosos provenientes de procesos de extracción del aceite de palma, constituyen uno de los residuos industriales con mayor carga orgánica.<sup>1,2</sup> Entre los componentes principales de estos efluentes, se encuentran los sólidos suspendidos, los aceites residuales y las sustancias fenólicas.<sup>3</sup>

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales existentes en las extractoras de la región del Magdalena Medio Colombiano, presentan buenos procesos para la remoción de sólidos suspendidos y de aceites residuales. Sin embargo, los compuestos fenólicos no se remueven eficientemente y se convierten en un problema ambiental debido a sus concentraciones altas en los vertimientos de las lagunas de tratamiento. La presencia de fenoles en las aguas residuales provenientes de la industria de extracción de aceites vegetales no es nueva, los compuestos fenólicos provenientes de estos procesos de extracción, son muy diferentes en su naturaleza química, a los fenoles provenientes de la industria del petróleo. Generalmente, los fenoles que provienen de fuentes naturales son de tipo polifenólico y tienen excelentes propiedades como antioxidantes, trampas de radicales libres y agentes quelantes de cationes divalentes; mientras que los fenoles sintéticos son catalogados como compuestos refractarios debido a su baja degradabilidad y su larga permanencia en los cuerpos hídricos.<sup>4</sup> Existen iniciativas encaminadas a aprovechar los polifenoles como antioxidantes naturales en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética.<sup>5, 6,7</sup>

En la actualidad no se conocen las características químicas de los compuestos fenólicos provenientes del procesamiento del fruto de la palma africana para la extracción del aceite en Colombia. Por lo cual, resulta pertinente realizar un estudio de los efluentes acuosos provenientes de los diferentes procesos, en términos de concentración y composición de la fracción fenólica; esta caracterización permitirá diseñar estrategias a corto plazo apropiadas para la

remoción o el aprovechamiento de estos compuestos. <sup>8, 9,10</sup>

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 Sector palmero en Colombia

La agroindustria de la Palma de Aceite en Colombia se encuentra localizada en las regiones de Orinoquia, Caribe, Interandina y Pacífica. En cada una de estas regiones la problemática ambiental tiene diferentes niveles de impactos relacionados con actividades humanas que afectan los ecosistemas, con consecuencias como la deforestación, erosión, arrastre de sedimentos, inundaciones, sequías, contaminación de suelos, aguas y aire.<sup>11</sup>

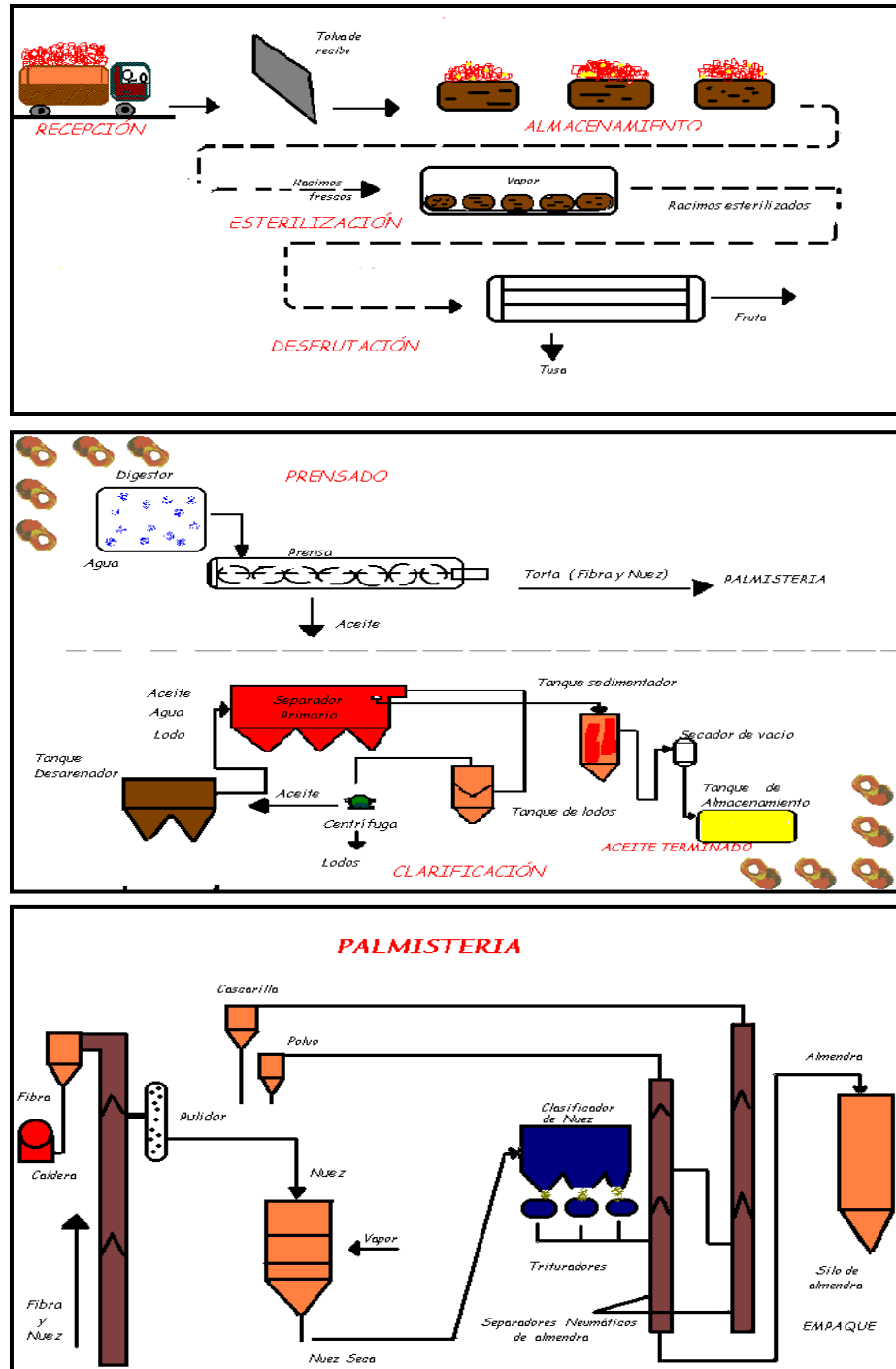
De acuerdo con la Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite (FEDEPALMA), en Colombia a mediados de la década de 1960 existían 18.000 hectáreas en producción las cuales aumentaron a 360.000 en el 2010. Estas zonas productivas se encuentran distribuidas en 73 municipios del país en cuatro zonas productivas, las cuales son: la zona Norte, que comprende Magdalena, Norte del Cesar, Atlántico y Guajira; la zona Central donde se encuentran los departamentos de Santander, Norte de Santander, sur del Cesar y Bolívar; la zona Oriental comprendiendo Meta, Cundinamarca, Casanare y Caquetá; y la zona Occidental que corresponde a Nariño. Los departamentos que poseen más área sembrada en palma de aceite en su orden son: Meta, Cesar, Santander, Magdalena, Nariño, Casanare, Bolívar, Cundinamarca y Norte de Santander. Colombia es el primer productor de palma de aceite en América Latina y el cuarto a nivel mundial después de Malasia, Indonesia y Nigeria.<sup>12</sup>

Según FEDEPALMA, en el año 2006, Colombia contaba con cincuenta y tres (53) Extractoras de aceite de palma africana, hoy en día son cincuenta y cuatro (54) en total.<sup>13</sup>

### 1.1.1 Proceso de extracción del aceite de palma.

La Figura No.1 muestra de forma esquemática del proceso de extracción del aceite de palma.

**Figura 1.** Proceso de extracción del aceite de palma africana.<sup>14</sup>



Las etapas del proceso se discuten a continuación:

- **Núcleo de producción de la palma**

Este núcleo está constituido por la primera etapa que consiste en la recolección de los frutos, el transporte a las plantas de extracción y la recepción de los mismos. Los racimos se cosechan 21 semanas después de la antesis, es decir, antes del período de floración de las plantas con flores; seleccionando aquellos que contengan la mayor concentración de aceite, los cuales se reconocen porque a) tienen un fruto pardo rojizo en la cima y rojo anaranjado en la base, b) aplicando una fuerza mínima se separan al menos dos frutos, y c) suelen observarse de dos a cinco frutos caídos en el suelo. Se depositan los frutos seleccionados en tolvas inclinadas, se pesan y se almacenan hasta que la fábrica esté lista para procesarlos.

- **Esterilización**

Es la etapa más importante del proceso de extracción, ya que es la que permite controlar el incremento de la acidez (%AGL), acelerar el proceso de ablandamiento de la unión de los frutos con su raquis (soporte natural) y disminuir la resistencia de los tejidos de la pulpa para hacer la digestión y el prensado de forma eficiente. Este proceso se basa en la acción de vapor de agua sobre los racimos de fruto fresco, teniendo en cuenta el tiempo de cocción y la temperatura.

- **Desfrutado**

En esta etapa se separa los frutos del racimo en un tambor rotatorio, donde el fruto se envía al digestor y el racimo al campo para utilizarlo como abono orgánico.

- **Digestión**

Se macera el fruto recogido durante el desfrutado por medio de agitación circular a una presión de 45 psi, con el fin de extraer las células de aceite y recuperarlo en el momento del prensado de forma eficiente.

### - **Prensado**

El fruto que sale de la digestión se prensa, donde se lavan las fibras para lograr la mejor extracción del aceite evitando pérdidas significativas del mismo. De este proceso se obtienen dos efluentes uno sólido y otro líquido, el sólido contiene la semilla del fruto y las fibras, el líquido se compone de una mezcla agua-aceite-lodos.

### - **Clarificación, secado y almacenamiento**

El aceite crudo proveniente del prensado contiene cantidades variables de impurezas solubles e insolubles de tipo vegetal, arena y agua, los cuales son removidos para dar al producto final claridad, estabilidad y buena apariencia; esto se hace por un proceso de clarificado al licor por la técnica de decantación y centrifugado. Se debe agregar agua de dilución para lograr una buena separación del aceite y de los lodos, ya que el aceite es altamente viscoso.

Los lodos de clarificación se depositan en un tanque para procesarlos en las centrifugas y poder recuperar el aceite que haya podido quedar en ellos (aceite recuperado), luego se envía a los florentinos donde se extrae el aceite residual; finalmente, se envía a las lagunas de tratamiento.

### - **Refinación**

En esta parte del proceso, se eliminan impurezas de los aceites y grasas como, metales pesados, fosfolípidos y pigmentos; por medio de una desacidificación en donde se destilan ácidos grasos libres y pigmentos residuales del aceite; y de un proceso de desodorización en el cual se destilan aldehídos y cetonas. <sup>15</sup>

### **1.1.2 Aguas residuales del proceso de extracción de aceite de palma africana, composición y utilización**

El proceso de extracción del aceite de palma consume una gran cantidad de agua; se estima que para producir una tonelada de aceite crudo, se requieren de 5 a 7,5



Dentro de los sólidos disueltos y suspendidos se encuentran fibras cortas, carbohidratos que van desde celulosa a simples azúcares, nitrógeno, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos libres y minerales<sup>23</sup>. Si estas aguas son eliminadas sin tratamiento previo a un cuerpo hídrico, se podría producir un problema ambiental serio debido a que el POME tiene altos índices de DBO<sub>5</sub> (25000mg/L), DQO (53630mg/L), grasas y aceites (8370mg/L), Nitrógeno total (0,5g/L), Nitrógeno amoniacal (0,2g/L), sólidos totales (43635 mg/L), sólidos suspendidos (19020 mg/L).

En Colombia el Gobierno Nacional expidió el decreto 3930 de 2010 que reglamenta los procedimientos y aspectos relacionados con la normatividad de vertimientos y establece que las Autoridades ambientales tienen la obligación de hacerlo cumplir, aplicando el decreto 1594 de 1984, donde se indican los límites permisibles para hacer descargas líquidas a un cuerpo hídrico, al suelo y/o alcantarillado.

En la Tabla No.1 se observan las concentraciones permisibles para el control de la carga de sustancias de interés sanitario contempladas en el Decreto 1594 de 1984.

El sistema más adecuado para el tratamiento primario del POME es la digestión anaerobia, ya que es una técnica muy benéfica debido a que disminuye costos, minimiza la concentración de lodos y produce metano.<sup>24</sup> En muchas extractoras de aceite se utiliza este proceso, para cumplir con los estándares de calidad de agua para los efluentes industriales. Sin embargo, el gas que se produce es quemado en teas, cuando podría ser utilizado para generar energía a través de turbinas de gas o como combustible en motores a gas.<sup>25</sup>

Existen alternativas a los tratamientos de digestión anaerobia, por ejemplo debido al alto contenido de proteínas, nitrógeno, carbohidratos, lípidos y minerales en el

POME, estas aguas pueden ser utilizadas en procesos microbiológicos, un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Sulaiman y Abdullah en el 2011, en el cual se obtuvieron 400m<sup>3</sup> de biogas a partir de 100 toneladas de POME.<sup>26</sup>

Este efluente también puede ser útil en la producción de fertilizantes<sup>27</sup> compostaje<sup>28</sup>, o en la obtención de hidrógeno<sup>29</sup>, y dióxido de carbono mediante procesos anaeróbicos.<sup>30</sup>

En la actualidad, en Malasia existe una planta para la obtención de energía renovable, conocida como Bumibiopower, donde se utiliza un sistema cerrado para atrapar el metano del POME.<sup>30</sup>

**Tabla 1.** Concentraciones en (mg/L) para el control de la carga de sustancias de interés sanitario.<sup>32</sup>

SUSTANCIA	EXPRESADA COMO	CONCENTRACION
Arsénico	As	0,5
Bario	Ba	5,0
Cadmio	Cd	0,1
Cobre	Cu	3,0
Cromo	Cr <sup>+6</sup>	0,5
Compuestos fenólicos	Fenol	0,2
Mercurio	Hg	0,02
Níquel	Ni	2,0
Plata	Ag	0,5
Plomo	Pb	0,5
Selenio	Se	0,5
Cianuro	CN <sup>-</sup>	1,0
Difenil policlorados	Concentracionde agente activo	No detectable
Mercurio orgánico	Hg	No detectable
Tricloroetileno	Tricloroetileno	1,0
Cloroformo	Extracto carbón Cloroformo (ECC)	1,0
Tetracloruro de carbono	Tetracloruro de carbono	1,0
Dicloroetileno	Dicloroetileno	1,0
Sulfuro de carbono	Sulfuro de carbono	1,0
Compuesos organoclorados	Concentración de agente activo	0,05
Compuesos organofosforados	Concentración de agente activo	0,10
Carbamatos	...	0,10

## 1.2 Los compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos aromáticos que llevan como mínimo un grupo hidroxilo, en la naturaleza se encuentran en la mayoría de plantas y son responsables de varias funciones y características como son el color, el sabor, la dureza y la capacidad antioxidante de las mismas, entre otras propiedades.<sup>31</sup>

Por otra parte los fenoles sintéticos pueden llegar a ser tóxicos e irritantes, causar náuseas, vómito, diarrea, colapso cardiovascular, cianosis, convulsiones, coma y muerte por falla respiratoria o shock<sup>32</sup>. Es por esto que muchas industrias centran su atención en la eliminación de estas sustancias de las aguas residuales para evitar contaminaciones y si es posible, reutilizar estas aguas. Se caracterizan por tener un núcleo aromático unido a un grupo hidroxilo, entre ellos se encuentran los clorofenoles, nitrofenoles, alquil fenoles y polihidroxibencenos.<sup>33</sup>

Los fenoles son utilizados en la producción de desinfectantes, antioxidantes y plaguicidas<sup>34</sup> y son generados en procesos industriales y en la transformación de productos naturales y químicos sintéticos.<sup>35</sup>

La incompleta remoción de estos compuestos fenólicos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (STAR), es considerada una de las principales fuentes generadoras de fenoles, si estas aguas son vertidas a fuentes hídricas pueden ocasionar daños severos en los ecosistemas; ya que los Fenoles pueden generar efectos tóxicos y nocivos para los seres vivos, especialmente los clorofenoles.<sup>36, 37</sup>

Gutiérrez<sup>38</sup> en el 2008 y Almajano<sup>39</sup> en el 2009, establecieron la presencia de compuestos fenólicos en aguas superficiales y subterráneas. Por otro lado, Ta Yeong Wu<sup>40</sup> en el 2009 y Sambanthamurthi<sup>41</sup> en el 2011 determinaron compuestos fenólicos en el POME; mientras Nagendran Balasundram en el 2005 encontró que las aguas provenientes del proceso de extracción del aceite de

palma contenían diferentes compuestos fenólicos incluyendo ácidos como gálico, clorogénico, protocatecuico, gentísico, cumárico, ferúlico, y cafeico que son naturales.

Los compuestos fenólicos, de tipo natural como el cresol y los ácidos siríngico, vanílico y p-hidroxibenzóico, provenientes de combustibles fósiles y de aceites esenciales, se encuentran en menor proporción en aguas naturales y son biodegradables.<sup>42</sup>

El método más utilizado para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales, es el ensayo de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la capacidad que tienen los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes como el molibdato y tungstato o wolframio sódico a pH básico). En esta técnica, los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo Folin-Ciocaltau, el cual está formado por la mezcla del ácido fosfotungstico ( $H_3HW_{12}O_{40}$ ) y el ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_4$ ). El Folin –Ciocalteau es reducido a una mezcla de óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción alrededor de 765 nm y es cuantificable por el método espectrofotométrico, utilizando como patrón el ácido gálico.<sup>42</sup>

Dependiendo de los compuestos presentes en la muestra puede haber variación en la intensidad del color que demuestra que cada uno de los fenoles reacciona de manera diferente con este compuesto. Por medio de este método, se puede llegar a una buena determinación de fenoles totales.

Luego de la determinación y detección de fenoles totales, si se desea reutilizar el agua residual, es conveniente buscar la estrategia más adecuada para tratar, eliminar, recuperar y/o utilizar los fenoles. Debido a que la agricultura es la actividad que requiere más demanda de agua, se están utilizando estas aguas para riego de plantaciones de palma y de caña de azúcar.

Actualmente se adelantan estudios sobre cuál es la mejor forma de realizar las extracciones de fenoles, sin que el agua se vea alterada y posteriormente conlleve a situaciones secundarias como sería la degradación del suelo y la alteración de los cultivos. El reúso de estas aguas tiene más ventajas que desventajas, ya que como son aguas tan ricas en nutrientes, el uso de fertilizantes se reduce así como la contaminación de las fuentes hídricas, garantizando un ahorro en el uso del agua pura.

Basándose en la insolubilidad que presentan los fenoles en aguas con contenidos de sales, se está estudiando la posibilidad de recuperar estos compuestos por métodos no destructivos que permitan una menor concentración y un posterior tratamiento biológico<sup>43</sup>. Como la sal permite separar la mezcla en dos fases, una orgánica y otra acuosa, así también la remoción de los fenoles ocurre a determinada concentración de sal.<sup>43</sup>

También existen métodos más avanzados, donde se usan reactores para la degradación de estos fenoles, ya que debido a la complejidad de estas sustancias requieren de un tratamiento especial y más desarrollado, cuyos resultados sean efectivos.<sup>44</sup>

Todos estos métodos permiten reducir la concentración de estas sustancias para su posterior reutilización, convirtiendo estos proyectos en auto sostenibles y ayudando a la conservación de las fuentes hídricas que día a día se hacen más escasas. Se deben escoger métodos adecuados y viables para evitar desperdicios y análisis incompletos.<sup>44</sup>

### **1.2.1 Métodos de cuantificación e identificación de fenoles**

Los métodos más utilizados para la determinación de compuestos fenólicos son: Espectrofotometría UV/VIS, FIA (*Flow Injection Analysis*), Cromatografía de gases (GC), Cromatografía de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar. Los métodos espectrofotométricos UV/VIS tienen desventajas como la baja especificidad, ya que se determinan la cantidad de fenoles totales presentes en la

muestra, sin distinguir entre los diferentes tipos de fenoles, además, existen compuestos fenólicos con sustituyentes arilo, alquilo nitro, benzoilo o carbonilo en las posiciones para del anillo aromático que no pueden ser detectados por este método.<sup>45</sup>

En la actualidad, se ha hecho necesario identificar individualmente los compuestos fenólicos para poder determinar su grado de toxicidad o su capacidad antioxidante, para lo cual se han empleado técnicas como: Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y electroforesis capilar (EC), acopladas a diferentes sistemas de detección.<sup>45</sup>

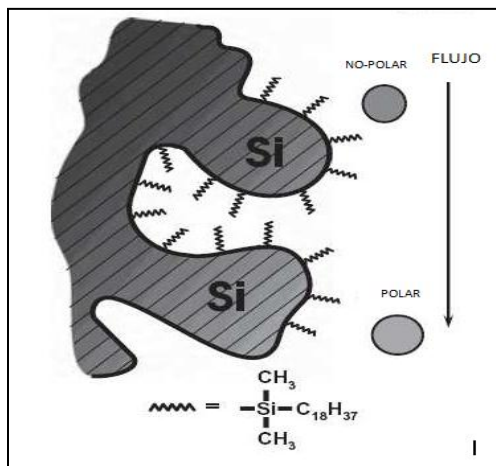
La GC es una de las más utilizadas para la determinación de fenoles, pero presenta cierta desventaja debido en gran parte a ciertas propiedades inherentes de los compuestos fenólicos como son la alta polaridad y la baja presión de vapor.<sup>45</sup>

En la actualidad HPLC se emplea rutinariamente, para cuantificar mezclas complejas de fenoles. La gran ventaja de esta técnica es la no utilización de derivatización, la cual es necesaria en la aplicación de GC. Además, puede determinar compuestos orgánicos volátiles como hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos, compuestos alifáticos saturados e insaturados con halógenos y algunos ésteres.<sup>45, 46</sup>

En la cromatografía líquida, la fase móvil (líquida), se bombea a alta presión a través de un material poroso o fase sólida estacionaria y el flujo eluye a un detector. Existen dos modos de operación en HPLC, normal y en fase inversa.

La Cromatografía en fase inversa(o reversa) es la más usada, y se aplica para el análisis de compuestos neutros y compuestos orgánicos polares. En la cromatografía en fase inversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es relativamente polar. En este tipo de cromatografía se usan columnas de sílica en un rango de pH de 2 a 7,5. <sup>46,47</sup>

**Figura 3.** Cromatografía en fase reversa<sup>47</sup>



En HPLC el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.

Un cromatógrafo de líquidos consta de unos elementos indispensables, formando módulos con funciones bien definidas. La fase móvil se desplaza a través de conductos tubulares muy pequeños con el fin de reducir el efecto de ensanchamiento de banda.

Los elementos del cromatógrafo son: sistema de suministro de fase móvil con un depósito de disolventes y una bomba de alta presión, sistema de inyección y detector continuo.

En los sistemas de suministro de fase móvil, ésta es bombeada a alta presión para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna, cuyo relleno muy compacto produce una sobrepresión.

Existen diferentes tipos de bombeo de alta presión con diferentes características, las más frecuentes son bombas de pistón.

La naturaleza de la fase móvil es clave en la separación de los picos y se puede trabajar de manera isocrática, donde la fase móvil permanece constante durante la separación y en gradiente, donde la composición de la fase de la fase móvil se va modificando durante la separación.

Para la inyección de la muestra, un volumen muy pequeño (microlitros) y preciso de muestra es inyectada a la entrada de la columna y en el menor tiempo posible, para evitar perturbar la circulación de la fase móvil, establecida entre la columna y el detector. El sistema más utilizado de inyección son las válvulas rotatorias de alta presión de varias vías manuales o automatizadas.

La columna de HPLC es un tubo recto de acero que mide entre 3 y 30 cm de longitud y su diámetro está entre 2 y 5 mm. La fase estacionaria se sostiene entre dos los discos porosos situados en los extremos de la columna.

El detector en HPLC debe ser muy sensible a concentraciones de analito pequeñas, tener un amplio rango lineal, poco ruido y ser muy estable durante el cromatograma, también es muy importante que la celda de flujo del detector tenga un volumen mínimo para evitar el ensanchamiento de las bandas. Entre los detectores más usados se encuentran los espectrofotométricos, los cuales miden la absorbancia a una o varias longitudes de onda en el rango ultravioleta y visible, los detectores de fluorescencia que miden la emisión fluorescente por parte de los analitos, solo es aplicable para compuestos fluorescentes, los detectores

electroquímicos, los cuales se basan en mediciones electroanalíticas como amperometría, coulombimetría, voltamperometría y los detectores refractométricos que se basan en los cambios del índice de refracción de la fase móvil por la presencia de un soluto.<sup>48,49</sup>

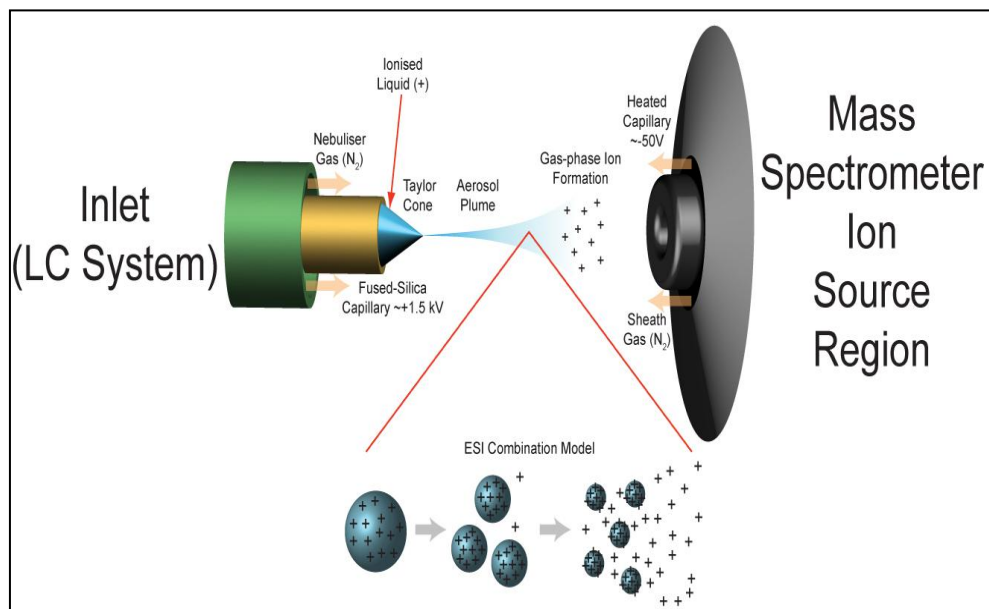
La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo, muy utilizada en la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o combinada con otras técnicas de espectrofotometría. Esta técnica se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, los cuales se separan de acuerdo a su masa y su carga y finalmente son detectados mediante un dispositivo adecuado. El espectro obtenido da una información bidimensional lo cual representa un parámetro relacionado con la abundancia de cada ión en función a su masa y su carga.<sup>50,51</sup>

Un espectrofotómetro de masas debe desempeñar funciones como: Volatilizar sustancias de volatilidades diferentes, originar iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa, separar los iones en función de su masa/carga y detectar los iones formados y registrar la información. Para cumplir con estas funciones el espectrofotómetro de masas cuenta con un sistema de introducción de muestra, una fuente de iones, un analizador para realizar la separación de los iones, un detector y registrador.

Con base en la naturaleza de la muestra, existen tres métodos para la introducción de la muestra dentro del equipo: introducción indirecta, donde la vaporización de la muestra se realiza mediante el calentamiento de un recipiente externo al espectrofotómetro; Introducción directa, aquí se introduce la muestra directamente en la fuente de iones mediante una varilla metálica la cual lleva en la punta un capilar y dentro la muestra, la cual se calienta de manera directa o indirecta; y finalmente la introducción a partir de un cromatógrafo.

Ya introducida la muestra dentro del equipo, se produce la ionización de la muestra, el método más utilizado es el electrospray (Figura 4), el cual consiste en introducir la muestra que se va a ionizar disuelta en un solvente más volátil, por un capilar de metal muy la muestra sale del capilar y forma un aerosol, una nube de pequeñas gotas (10  $\mu\text{m}$ ) altamente cargadas. Conforme el solvente se evapora, las moléculas de muestra se aproximan, se repelen y finalmente, este proceso se repite hasta que la muestra esté libre de solvente, de modo que no quedan más que iones y estos iones se desplazan hacia el analizador de masas.<sup>50,51</sup>

**Figura 4.** Ionización Electrospray<sup>49</sup>



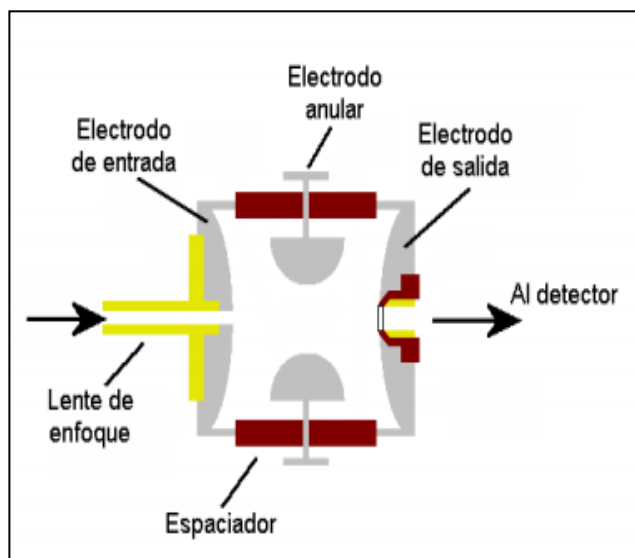
Los analizadores más utilizados son, el de campo magnético, el analizador cuadrupolar y el analizador de trampa de iones.

El analizador de trampa de iones (Figura 5), es un dispositivo formado por tres electrodos de superficie hiperbólica, y entre estos, el electrodo central es anular y los electrodos superiores e inferiores cierran el anillo. Los tres electrodos forman una cavidad, donde se produce la ionización, la fragmentación y el análisis de masas. Entre los electrodos superior e inferior se aplica una potencia de radio

frecuencia de tal forma que los iones generados queden confinados dentro de la cavidad.<sup>50,51</sup>

Los iones son expulsados de la cámara tras la aplicación de rampas de radiofrecuencia. Conforme aumenta el voltaje, aumenta la amplitud de su movimiento oscilatorio hasta ser expulsados. Los iones de mayor masa se desestabilizan conforme va aumentando el voltaje de radiofrecuencia, de tal forma que los iones se detectan de forma secuencial, obteniendo así el espectro en función del voltaje y la masa.<sup>50, 51</sup>

**Figura 5.** Esquema de un analizador de trampa de iones.<sup>51</sup>



## 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiales y reactivos

#### 2.1.1 Reactivos.

Para el desarrollo del proyecto se emplearon: n-hexano, acetato de etilo, Reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio al 7,5%, Cartuchos C18, filtro con

microporo o HV de ,45µm, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido protocatechuic, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido p-cumárico, metanol, ácido acético y agua grado HPLC. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

### **2.1.2 Equipos y material de laboratorio.**

Los materiales y equipos de laboratorio utilizados fueron: placa de calentamiento marca Termo científico, balanza analítica marca Kern 770, ultracentrífuga J2-21 marca Beckman, espectrofotómetro Milton Roy Company, Espectronic 601.

### **2.2 Muestras.**

Las muestras fueron tomadas en la empresa Palmera Agroince S.A, especializada en la extracción del aceite de palma africana. Para el muestreo se siguió el procedimiento estipulado en el Standard Methods edición 22 de 2012 para muestreos compuestos.<sup>52</sup>

Se realizó una visita técnica a la empresa extractora de aceite de palma africana Agroince S.A, para conocer el proceso industrial de extracción de aceite y estipular los puntos de toma de muestra.

La toma de muestra se realizó en las etapas del proceso donde hubo generación representativa de aguas residuales provenientes del proceso de extracción, estas fueron: Salida condensadores, Salida centrifugas, Salida hidrociclón, y en la planta de tratamiento de agua residual (PTAR), Entrada PTAR, Salida laguna anaerobia, Salida lagunas facultativas.

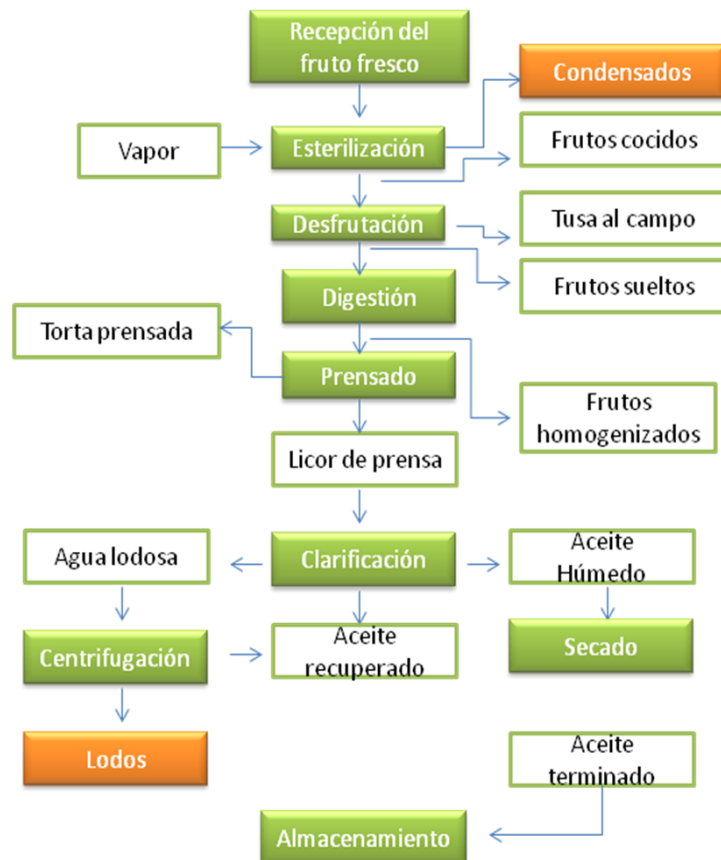
Se tomó cada hora una muestra puntual durante ocho horas del proceso en cada uno de los puntos estipulados, posteriormente se obtuvo una muestra compuesta de cada punto, la cual fue preservada con ácido sulfúrico a pH < 2 para evitar alteraciones en la concentración de los fenoles. Finalmente, la muestra fue

refrigerada y transportada al laboratorio según los lineamientos establecidos en el S.M. (antes de 24 horas).<sup>52</sup>

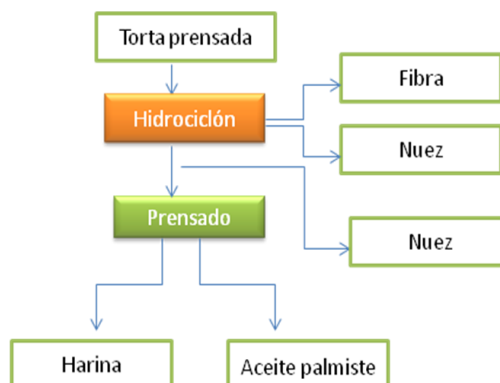
En la **Figura 6**, se presenta la secuencia del proceso llevado a cabo en la empresa, para la extracción del aceite de palma africana, identificándose con color naranja los puntos de muestreo.

**Figura 6.** Proceso de extracción del aceite de palma africana y puntos de toma de muestras de las aguas residuales generadas. A: Extracción de aceite de palma<sup>53</sup>, B: Extracción de aceite Palmiste, C: Planta de tratamiento de guas residuales (PTAR).

#### A. Extracción del aceite



## B. Extracción del Palmiste



## C. Planta de tratamiento de aguas residuales



Las muestras tomadas en la empresa fueron llevadas al laboratorio para realizar los correspondientes análisis.

### 2.3 Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación del contenido de los fenoles totales, se realizó mediante dos métodos; el primero fue el reportado en el Standard Methods edición 22 de 2012, método colorimétrico 5530 B, D y el segundo fue el descrito por Wollgast (2004), mediante el ensayo de Fiolin-ciocalteau (F-C).

#### 2.3.1 Método colorimétrico 5530 B, D Standard Methods edición 22 de 2012

Se tomaron 500ml de cada uno de los patrones entre 0,04 y 1 mg Fenol/L, se les ajustó el pH a 4 con una solución de NaOH 2,5 N, se destiló de cada uno 450ml

en balones de destilación, se les adicionó 50ml de agua destilada y se continuó con la destilación hasta completar 500mL. Se tomaron 100mL de cada destilado en vasos de precipitado y se les adicionó 2,5ml de una solución de amoniaco de 0,5N, en seguida se les ajusto el pH a  $7,9\pm 0,1$  con la solución tampón de fosfatos. Posteriormente se desarrolló el color, adicionando 1ml de 4-aminoantipirina seguido de 1ml de ferricianuro de potasio.

Para finalizar, se leyeron las absorbancias después de 15 minutos, en el espectrofotómetro Milton Roy Company Spectronic 601, ubicado en el laboratorio de la sede UIS- Guatiguará, a una longitud de onda de 500nm.

El tratamiento de las muestras se realizó de la misma manera que para los patrones y la concentración de fenoles de cada muestra se obtuvo de la curva de calibración.

El resultado se expresó como mg Fenol /L.

### **2.3.2 Ensayo de Folin-ciocalteau (F-C): Técnica descrita por Wollgast (2004).**

Se tomaron 50  $\mu$ L del extracto resultante de la eliminación de la grasa y la extracción de los fenoles (Ver sección 2.4.2.1.2) y 1,5 mL del reactivo de Folin – Ciocalteau diluido 10 veces, se mezcló y después de 5 minutos se les adicionó 1,5ml de carbonato de sodio al 7,5%. Esta mezcla se dejó a la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leyó su absorbancia a 765nm en el espectrofotómetro Spectronic Milton Roy Company.

Se realizó una curva de calibración tomando como patrón de referencia el ácido gálico y se prepararon patrones entre 25 y 250 mg/L ácido gálico. El resultado se expresó como miligramos de ácido gálico /Litro de solución (mg AG/L).

## **2.4 Identificación y cuantificación del contenido fenólico presente en el efluente molido del aceite de palma (POME) o agua residual del proceso de extracción del aceite de palma africana.**

### **2.4.1 Determinación por cromatografía de gases acoplada a masas**

#### **2.4.1.1 Composición química del POME (cantidad relativa, % e identificación tentativa):**

Este análisis solo se realizó en la muestra que presentó mayor concentración de fenol total y fue desarrollado en el laboratorio de cromatografía - CENVAM de la Universidad Industrial de Santander, al igual que los análisis por GC/MS de los fenoles totales, determinados a la entrada y salida de la PTAR.

La preparación de la muestra se llevó a cabo con base en el método EPA 3510 C (extracción líquido-líquido por lotes), para el aislamiento de los compuestos orgánicos se empleó una solución de n-hexano: acetona (50:50) como solvente de extracción.

La separación y detección de las sustancias aisladas se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890 series Plus (Agilent Technologies 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full Scan). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) [5%-fenil-poli (metilsiloxano), 60m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m]. La inyección se realizó en modo split (30:1),  $V_{iny}+2\mu$ L. (Ver anexo 1).

#### **2.4.1.2 Determinación del contenido de fenoles por cromatografía de gases acoplada a masas, en los puntos entrada a la PTAR y salida facultativas.**

La extracción de estos compuestos se realizó con base en el método EPA 3520 C y su posterior análisis por cromatografía de gases (GC) con detección selectiva de masas en el modo de monitoreo de ion(es) seleccionado(s) (SIM). Como material de referencia se utilizó la mezcla certificada de fenoles (Part No. M-528-CONC,

AccuStandard, Inc., 125 Market Street, New Haven, CT 06513). El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890 series Pluss (Agilent technologies, Palo alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies 5973), operado en modo SIM [monitoreo de ion (es) seleccionado (s)]. La columna empleada en el análisis fue DB-5MS [5%-fenil-poli(metilsiloxano), 60m x 0,25mm x 0,25µm]. La inyección se realizó en modo Splitless ( $V_{iny}=2\mu\text{L}$ ). (Ver anexo 2).

## **2.4.2 Determinación por HPLC acoplada a masas.**

### **2.4.2.1 Preparación de la muestra para análisis**

#### **2.4.2.1.1 Eliminación de las grasas**

Para llevar a cabo la extracción de los fenoles de la muestra, fue necesario eliminar las grasas. Se tomaron 50 mL de muestra, se les adicionó 75 mL de hexano y se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm, eliminando la capa de hexano. Este proceso se repitió 2 veces más.

#### **2.4.2.1.2 Extracción de fenoles**

Para la extracción de los fenoles de la muestra, se tomó la muestra libre de grasa, se le adicionaron 50 mL de acetato de etilo, se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm y se recogió la capa de acetato donde se encuentran disueltos los fenoles. Este proceso se repitió 2 veces más reuniendo los extractos. El acetato de etilo se evaporó de la muestra mediante la adición de nitrógeno. El residuo seco se disolvió en 3 mL de metanol. Esta solución se utilizó para la determinación de los fenoles.

#### **2.4.2.1.3 Eliminación de impurezas**

Para la eliminación de impurezas de los extractos, se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida C18. Los cartuchos se acondicionaron pasando 5 ml de la solución metanol-agua 5:95v/v, se pasaron 3 mL de muestra por cada cartucho

y se recogió el filtrado en un tubo de ensayo. Posteriormente este extracto se pasó a través de un filtro con Milipore tipo HV de 0,45  $\mu\text{m}$  y se guardó a 4°C en tubos de Eppendorf para su posterior análisis.

#### **2.4.2.2 Determinación y cuantificación**

El análisis de los ácidos fenólicos en los extractos de las aguas residuales se realizó usando un cromatógrafo líquido LaChrom Elite, VWR, equipado con una bomba cuaternaria LaChrom Elite L-2130, un inyector automático LaChrom Elite L-2200, un detector Lachrom Elite UV-L2400 y columna Zorbax C18 (250mm X i.d. 4,6mm, 5 $\mu\text{m}$ ), acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Daltonics AmazonX con analizador de trampa iónica, y una fuente de ionización por electrospray. La fase móvil consistió de una solución de ácido acético al 1,25% y metanol. El flujo utilizado fue de 1,5ml/minuto. El volumen de muestra que se inyectó fue de 25 $\mu\text{L}$ .

La cuantificación se hizo por el método de estándar externo, preparando soluciones patrón de los siguientes ácidos fenólicos: ácido Gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido protocatechuic, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido p-cumárico, y del fenol.

En la identificación de los fenoles, se compararon los tiempos de retención de los analitos, con los tiempos de retención de las respectivas sustancias de referencia, y los espectros de masas y el patrón de fragmentación observado, con los espectros reportados en la literatura, obtenidos bajo condiciones de análisis similares.<sup>53</sup>

**2.4.2.3 Figuras analíticas de mérito.** Se calcularon de acuerdo a lo recomendado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).<sup>54</sup>

#### **2.4.2.3.1 Linealidad y la sensibilidad del método.**

Teniendo en cuenta las curvas de calibración obtenidas para cada analito, se evaluó la linealidad y sensibilidad del método. La linealidad se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el cuadrado del coeficiente de determinación. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%. Repetibilidad del método para tiempos de retención ( $t_R$ ) y áreas. La repetibilidad del método se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV) del tiempo de retención ( $t_R$ ) y del área, para una solución 50 mg/L de Fenol

#### **2.4.2.3.2 Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).**

Los límites de detección y cuantificación se calcularon haciendo uso de la curva de calibración de cada patrón [51].

$$\text{LOD} = (3 * 3S) / m$$

**Ecuación 1**

$$\text{LOQ} = 10S / m$$

**Ecuación 2**

Donde:

S = Desviación estándar

m = pendiente de la curva

LOD= Límite de detección

LOQ = Límite de cuantificación.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Determinación del contenido de fenoles totales

##### 3.1.1 Método colorimétrico 5530 B-D del Standard Methods edición 22 de 2012.

###### 3.1.1.1 Curva de calibración:

A partir de la solución de 1000 mg/L de fenol se preparó un patrón de 100 mg/L, tomando 25 ml de la solución de 1000 mg/l y aforando a 250 mL.

De la solución de 100 mg/L se prepararon patrones de 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 10, mg/L de Fenol, ver datos en la Tabla 2 y Figura 7.

**Tabla 2.** Datos curva de Calibración Método colorimétrico 5530 B-D del Standard Methods edición 22 de 2012.

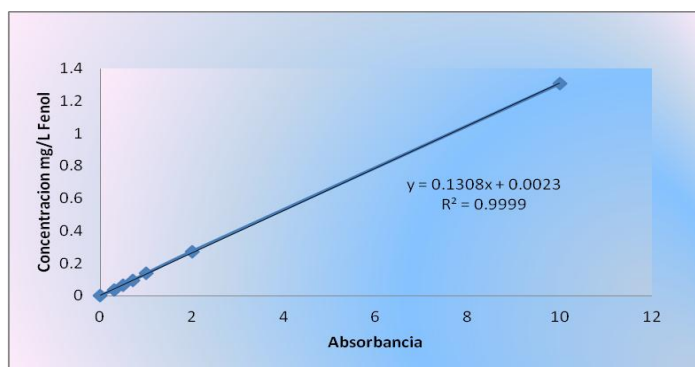
Concentración mg/L Fenol	Curva 1	Curva 2	Curva 3	desviacion estandar	Promedio	coeficiente de variación
	Absorbancias					
0,3	0.038	0.036	0.037	0.0010	0.037	2.703
0,5	0.067	0.066	0.067	0.0006	0.067	0.866
0,7	0.091	0.093	0.092	0.0010	0.092	1.087
1	0.137	0.136	0.136	0.0006	0.136	0.423
2	0.273	0.273	0.272	0.0006	0.273	0.212
10	1	1	1.312	0.0023	1.311	0.176

En la Tabla 2, se observó una buena linealidad en todo el intervalo de concentraciones analizadas. Esto es reflejado en los valores bajos de las desviaciones estándar y de los coeficientes de variación, por lo tanto se cumple la ley Beer en dicho rango de concentraciones.

**Tabla 3** Datos curva de Calibración Método colorimétrico 5530 B-D S.M (límites de detección).

Concentración mg/L Fenol	Curva 2
	Absorbancia
0,3	0,036
0,5	0,066
0,7	0,093
1	0,136
2	0,273
10	1,308
<b>Pendiente</b>	0,1302
<b>Intercepto</b>	0,0023
<b>Coef. correlación</b>	0,9999
<b>Límite de detección (mg/L Fenol)</b>	0,07
<b>Límite de cuantificación mg/L Fenol)</b>	0,08

**Figura 7.** Curva de Calibración Método colorimétrico 5530 B-D S.M.



Se presentó un valor alto en el coeficiente de correlación (0,9999), lo cual indica una fuerte correlación entre las variables (concentración y absorbancia).

Por otro lado, se comprobó que el método presenta una alta sensibilidad ya que la pendiente fue significativamente diferente de cero (Tabla3).

La evaluación de los límites de detección y cuantificación presentados en la Tabla 3, fueron determinados según lo estipulado en el numeral 2.4.2.3.2.

### 3.1.1.2 Análisis de Muestras

#### 3.1.1.2.1 Primer monitoreo

**Tabla 4.** Concentraciones de fenoles totales en muestras (Método colorimétrico 5530 B-D S.M) Primer monitoreo

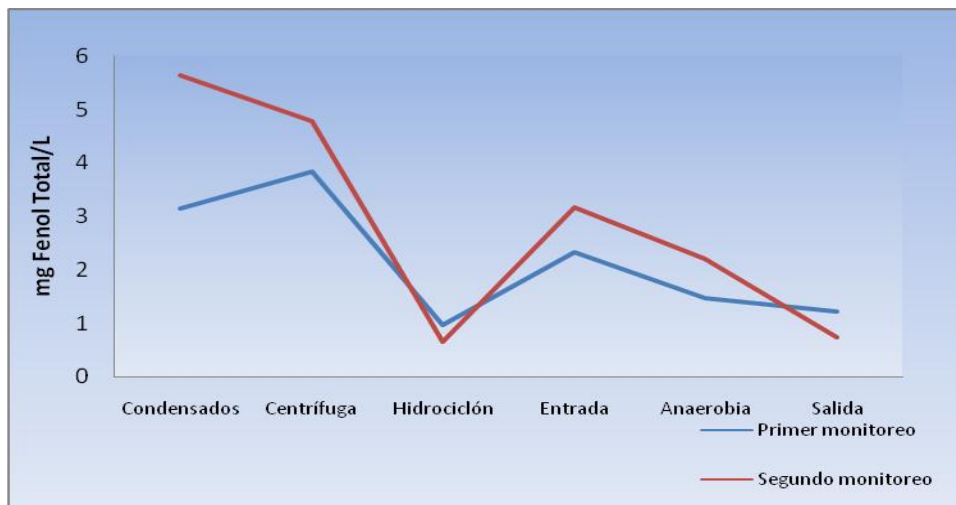
NOMBRE	ABSORBANCIAS			CONCENTRACIONES mg/L FENOL			DESVIACION ESTANDAR	PROMEDIO mg/L FENOL	COEFICIENTE DE VARIACION
	1	2	3	1	2	3			
SALIDA CONDENSADOS	0.413	0.417	0.411	3.140	3.170	3.125	0.023	3.15	0.74
SALIDA CENTRIFUGA	0.503	0.509	0.503	3.828	3.874	3.828	0.026	3.84	0.69
SALIDA HIDROCICLÓN	0.124	0.13	0.129	0.930	0.976	0.969	0.025	0.96	2.56
ENTRADA PTAR	0.305	0.31	0.307	2.314	2.352	2.330	0.019	2.33	0.83
SALIDA ANAEROBIA	0.193	0.198	0.19	1.458	1.496	1.435	0.031	1.46	2.11
SALIDA PTAR	0.159	0.159	0.164	1.198	1.198	1.236	0.022	1.21	1.82

#### 3.1.1.2.2 Segundo monitoreo

**Tabla 5.** Concentraciones de fenoles totales en muestras (Método colorimétrico 5530 B-D S.M) segundo monitoreo.

NOMBRE	ABSORBANCIAS			CONCENTRACIONES mg/L FENOL			DESVIACION ESTANDAR	PROMEDIO mg/L FENOL	COEFICIENTE DE VARIACION
	1	2	3	1	2	3			
SALIDA CONDENSADOS	0.724	0.72	0.78	5.518	5.487	5.946	0.256	5.65	4.54
SALIDA CENTRIFUGA	0.629	0.643	0.61	4.791	4.898	4.646	0.127	4.78	2.65
SALIDA HIDROCICLÓN	0.087	0.091	0.084	0.648	0.678	0.625	0.027	0.65	4.13
ENTRADA PTAR	0.413	0.416	0.42	3.140	3.163	3.193	0.027	3.17	0.85
SALIDA ANAEROBIA	0.286	0.29	0.295	2.169	2.200	2.238	0.034	2.20	1.57
SALIDA PTAR	0.097	0.103	0.094	0.724	0.770	0.701	0.035	0.73	4.79

**Figura 8.** Comparación de la concentración de fenoles totales (primer y segundo monitoreo) método colorimétrico 5530 B-D del Standard Methods edición 22 del 2012.



En el primer y segundo monitoreo, se observó que en los puntos de muestreo, salida de la centrifuga, Salida de condensadores y entrada PTAR, se encontraron las mayores concentraciones en fenoles totales, determinados mediante el método colorimétrico 5530 B-D del Standard Methods edición 22 del 2012(Figura 8). Los datos reportados presentan unos coeficientes de variación inferiores al 5% y unas desviaciones estándar bajas, por lo tanto, estos datos presentan un alto grado de aceptación (Tabla 4 y 5).

### 3.1.2 Ensayo Folin-Ciocalteu.

#### 3.1.2.1 Curva de calibración:

A partir de la solución de 500 mg AG/L se prepararon soluciones de 25, 50, 100, 200, 250 mg AG/L.

**Tabla 6.** Datos curvas de Calibración Ensayo Folin-Ciocalteau.

Concentración mg AG/L	Curva 1	Curva 2	Curva 3	desviación estándar	Promedio	coeficiente de variación
	Absorbancias					
25	0,019	0,02	0,02	0,0006	0,020	2,986
50	0,039	0,041	0,039	0,0012	0,040	2,911
100	0,085	0,085	0,083	0,0012	0,084	1,369
200	0,172	0,173	0,175	0,0015	0,173	0,881
250	0,216	0,216	0,213	0,0017	0,215	0,806

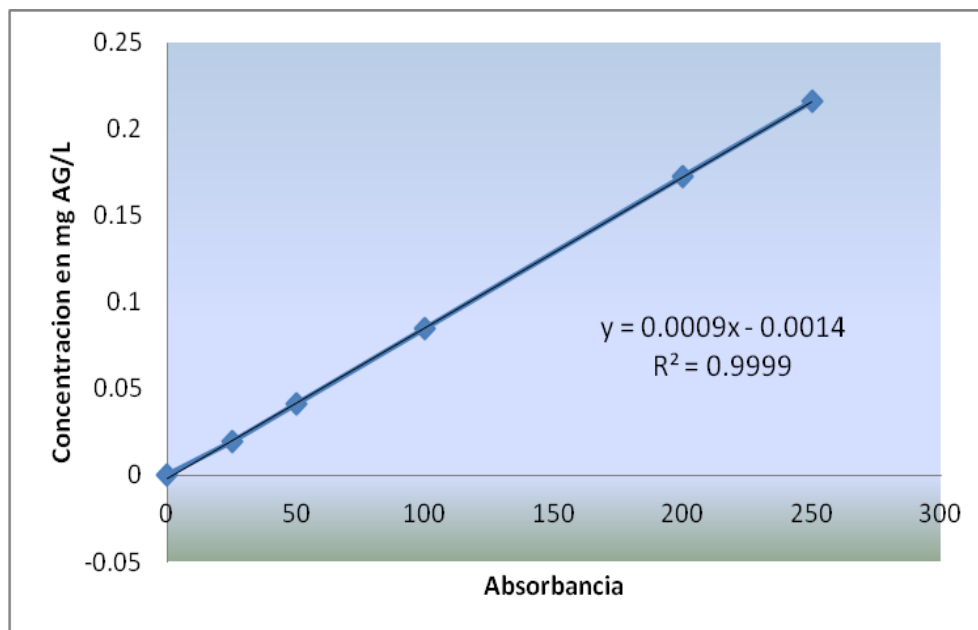
En la Tabla 6 y en la Figura 9, se observó una buena linealidad en todo el intervalo de concentraciones analizadas. Esto es reflejado en los valores bajos de las desviaciones estándar y de los coeficientes de variación, por lo tanto se cumple la ley Beer en dicho rango de concentraciones.

La curva utilizada para la determinación de las muestras fue la No. 2, la cual presentó mejor coeficiente de correlación.

**Tabla 7.** Datos curva de Calibración Ensayo Folin-Ciocalteau (límites de detección)

Concentración mg AG /L	Curva 2
	Absorbancia
25	0,02
50	0,041
100	0,085
200	0,173
250	0,216
<b>Pendiente</b>	0,0009
<b>Intercepto</b>	0,0014
<b>Coef. correlación</b>	0,9999
<b>Límite de detección (mg/L AG)</b>	12,4
<b>Límite de cuantificación (mg/L AG)</b>	13,3

**Figura 9.** Curva de Calibración Ensayo Folin-Ciocalteu



Se presentó un valor alto en el coeficiente de correlación (0,9999), lo cual indica una fuerte correlación entre las variables (concentración y absorbancia).

Por otro lado, se comprobó que el método presenta gran sensibilidad ya que la pendiente fue diferente de cero. La evaluación de los límites de detección y cuantificación presentados en la Tabla 7, fueron determinados según lo estipulado en el numeral 2.4.2.3.2

### **3.1.2.2 Análisis de muestras**

#### **3.1.2.2.1. Primer monitoreo**

**Tabla 8.** Concentraciones de fenoles totales en muestras (Primer monitoreo)  
(Ensayo Folin-Ciocalteu).

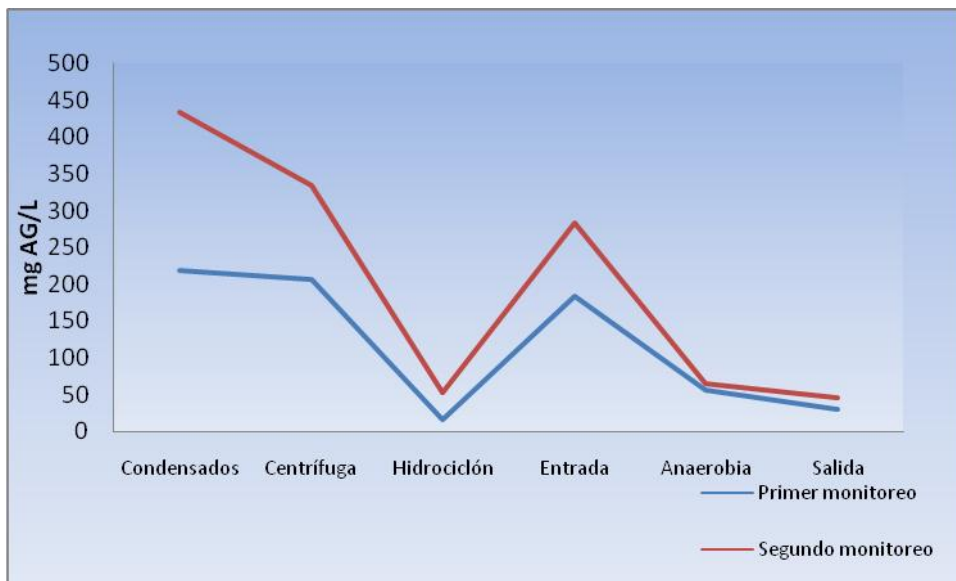
NOMBRE	ABSORBANCIAS			CONCENTRACIONES mg AG/L			DESVIACION ESTANDAR	PROMEDIO mg AG/L	COEFICIENTE DE VARIACION
	1	2	3	1	2	3			
SALIDA CONDENSADOS	0.193	0.198	0.194	216.000	221.556	217.111	2.940	218.22	1.35
SALIDA CENTRIFUGA	0.184	0.183	0.185	206.000	204.889	207.111	1.111	206.00	0.54
SALIDA HIDROCICLÓN	0.013	0.012	0.013	16.000	14.889	16.000	0.642	15.63	4.10
ENTRADA PTAR	0.161	0.163	0.165	180.444	182.667	184.889	2.222	182.67	1.22
SALIDA ANAEROBIA	0.048	0.049	0.051	54.889	56.000	58.222	1.697	56.37	3.01
SALIDA PTAR	0.025	0.026	0.025	29.333	30.444	29.333	0.642	29.70	2.16

### 3.1.2.2 Segundo monitoreo

**Tabla 9.** Concentraciones de fenoles totales en muestras (Segundo muestreo) (Ensayo Folin-Ciocalteu).

NOMBRE	ABSORBANCIAS			CONCENTRACIONES mg AG/L			DESVIACION ESTANDAR	PROMEDIO mg AG/L	COEFICIENTE DE VARIACION
	1	2	3	1	2	3			
SALIDA CONDENSADOS	0.389	0.390	0.387	433.778	434.889	431.556	1.697	433.41	0.39
SALIDA CENTRIFUGA	0.298	0.3	0.301	332.667	334.889	336.000	1.697	334.52	0.51
SALIDA HIDROCICLÓN	0.044	0.048	0.047	50.444	54.889	53.778	2.313	53.04	4.36
ENTRADA PTAR	0.251	0.254	0.256	280.444	283.778	286.000	2.796	283.41	0.99
SALIDA ANAEROBIA	0.055	0.058	0.056	62.667	66.000	63.778	1.697	64.15	2.65
SALIDA PTAR	0.039	0.04	0.039	44.889	46.000	44.889	0.642	45.26	1.42

**Figura 10.** Comparación de la concentración de fenoles totales (primer y segundo monitoreo) método Folin-Ciocaltau.



En el primer y segundo monitoreo, se observó que en los puntos de muestreo, salida de la centrifuga, Salida de condensadores y entrada PTAR: se encontraron las mayores concentraciones en fenoles totales determinados mediante el ensayo Folin-Ciocaltau. Los datos reportados presentan unos coeficientes de variación inferiores al 5%, y unas desviaciones estándar muy bajas, por lo tanto, estos datos presentan un alto grado de aceptación. y unas desviaciones estándar bajas, por lo tanto, estos datos presentan un alto grado de aceptación(Tablas 8 y 9).

### 3.2 Identificación y Cuantificación del contenido de fenoles totales

#### 3.2.1 Determinación por cromatografía de gases acoplada a masas

##### 3.2.1.1 Composición química del POME

Se realizó una identificación tentativa por GC-MS y se halló la cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en los extractos obtenidos de la muestra Salida

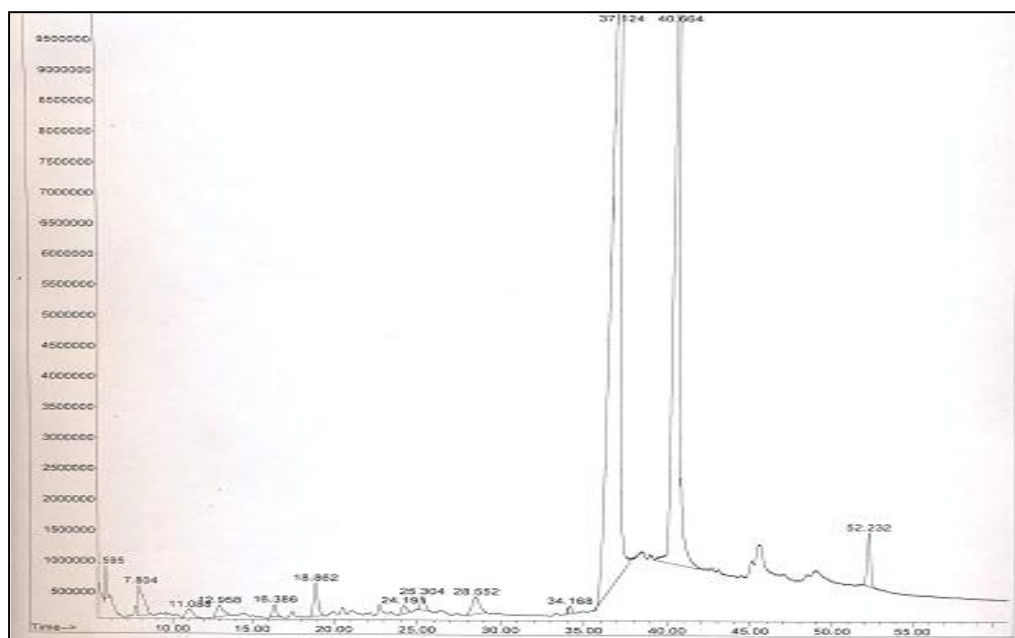
Centrifuga. En la Tabla 10 y en la Figura 11, se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 10.** Datos de la identificación tentativa por GC-MS

N. Pico	t <sub>R</sub> (min)	Identificación Tentativa	Cantidad Relativa %
1	5.60	Furano metanol	0.4
2	7.81	Fenol*	1.6
3	11.09	Maltol	0.7
4	12.96	Picolinato de metilo	0.7
5	16.39	Vinilguaiacol*	0.4
6	18.86	Vanilina	1.2
7	24.19	Trimetoxifenol*	0.4
8	25.30	Siringaldehído*	0.5
9	28.55	Acido mirístico	1.2
10	34.17	Palmitato de metilo	0.2
11	37.12	Acido palmitico	57.5
12	40.66	Acido oleico	33.6
13	52.23	Escualeno	1.6

\*Compuestos fenólicos

**Figura 11.** Datos identificación tentativa por GC-MS

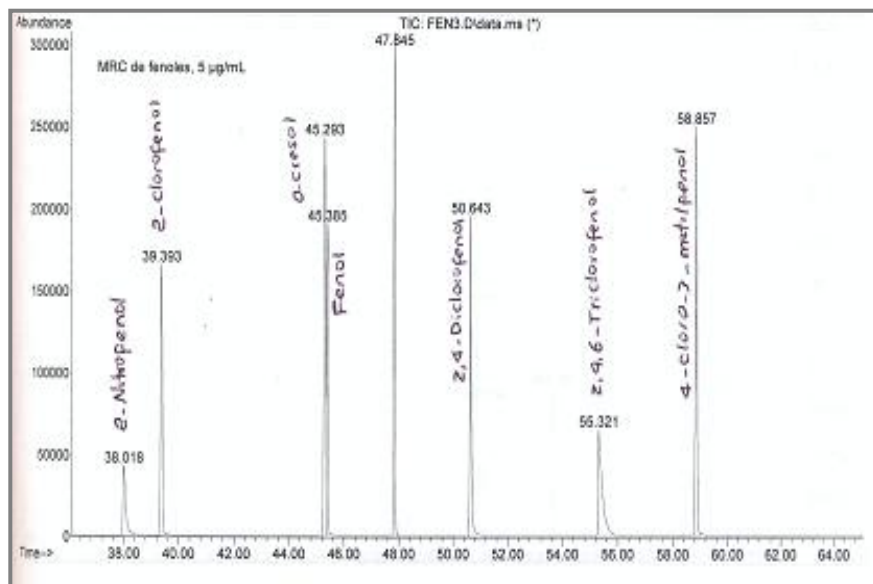


En la muestra, aparecen las sustancias fenólicas fenol ( $t_R = 7,81$  min), Vinilguaiacol ( $t_R = 16,39$  min); Trimetoxifenol ( $t_R = 24,19$  min) y Siringaldehído ( $t_R = 25,30$  min).

### 3.2.1.2 Determinación de los fenoles a la entrada de la PTAR y a la salida de las lagunas facultativas.

Para realizar la identificación y cuantificación de fenoles, se pasaron mezclas de patrones de diferentes concentraciones (ver Figura 12).

**Figura 12.** Cromatograma patrón de 5µg/L de fenoles.



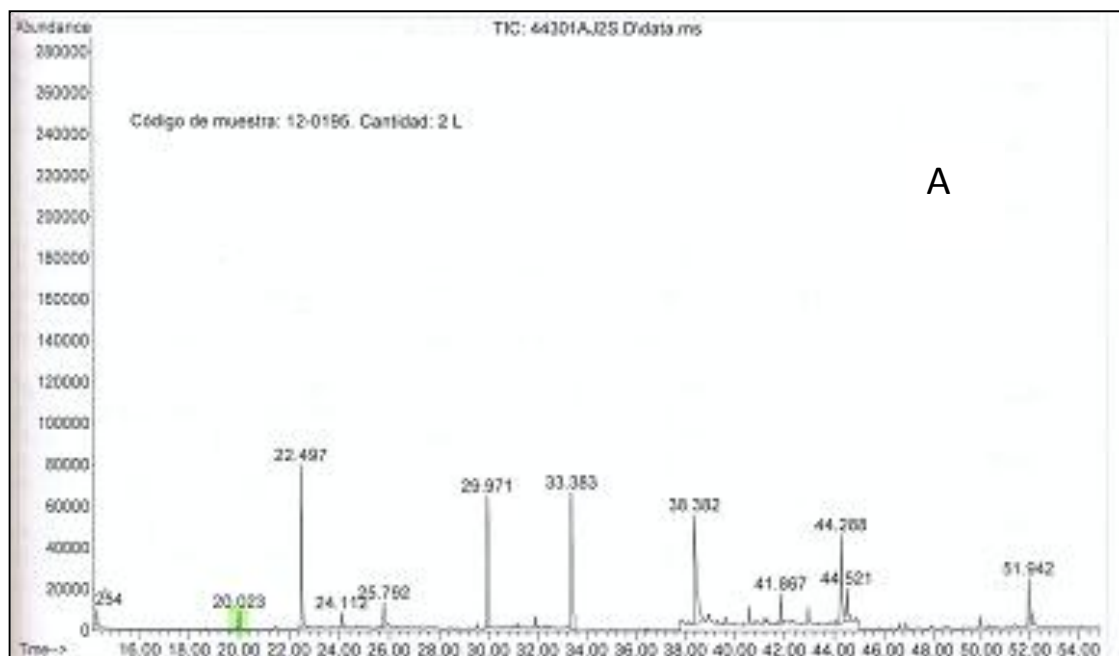
En la Tabla 11, se contemplan los niveles mínimos de cuantificación de MSD/SIM (S/N=5), iones característicos empleados en el monitoreo por GC-MS/SIM, porcentajes de recuperación (%) obtenidos por la extracción líquido-líquido continua y cuantificación de los fenoles en las muestras de aguas (1L).

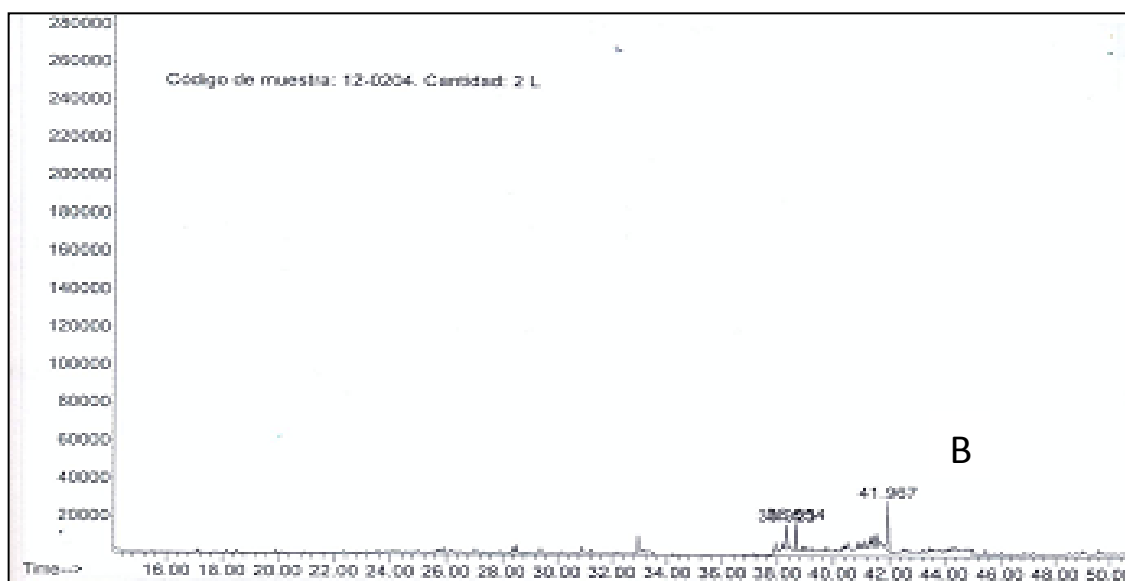
**Tabla 11.** Resultados obtenidos del análisis de las muestras Entrada PTAR y Salida Facultativas.

COMPUESTOS	t <sub>R</sub> (min)	Iones característicos m/z	NMC* µg/L	Porcentaje de recuperación n %	Concentración µg/L Entrada PTAR	Concentración µg/L Salida Facultativas
Fenol	19,96	63, 65, 66, <u>94</u>	0,5	130	62,8	0,5
2-Clorofenol	20,53	64, 92, 128, 130	0,1	71	<0,1	<0,1
O-Cresol	23,18	79, 90, 107, <u>108</u>	0,1	74	<0,1	<0,1
2-Nitrofenol	26,57	81, 108, 122, <u>139</u>	0,2	77	<0,1	<0,1
2,4-Dimetilfenol	27,05	91, 107, 121, <u>122</u>	0,1	81	<0,1	<0,1
2,4 Diclorofenol	28,05	98, 126, <u>162</u> , 164	0,1	70	<0,1	<0,1
4-Cloro-3-metilfenol	32,45	77, 107, <u>142</u> , 144	0,1	83	<0,1	<0,1
2,4,6-Triclorofenol	35,15	132, 160, <u>196</u> , 198	0,1	81	<0,1	<0,1
3,5-dinitro-3-metilfenol	43,39	91, 107, 154, <u>184</u>	0,5	81	<0,3	<0,3

NMC\*=Nivel mínimo de cuantificación; - Pico base

**Figura 13.** Determinación de los fenoles presentes en las aguas residuales del proceso de extracción del aceite de palma; A. Perfil cromatográfico de la muestra entrada PTAR; B. Perfil cromatográfico de la muestra Salida Facultativas.





En las dos muestras se detectó Fenol por encima del nivel mínimo de detección del método empleado ver (Tabla 11). Adicionalmente en el extracto de la muestra Entrada PTAR, se identificaron los compuestos metilfenol con  $t_R= 24,0$  min; etilfenol con  $t_R= 27,6$  min, etilmetoxifenol con  $t_R= 31,8$  min; metoxivinilfenol con  $t_R= 33,3$  min; etilcatecol con  $t_R= 35,9$  min; hidroxibencenoetanol con  $t_R= 31,8$  min; vanillol con  $t_R= 38,4$  min; ácido hidroxibenzoico  $t_R= 40,8$  min; trimetoxifenol con  $t_R= 42,9$  min, ácido hidroximetoxibencenoacético con  $t_R= 44,2$  min; siringaldehído con  $t_R= 44,5$  min; ácido hidroximetoxibencenopropanoico con  $t_R= 46,5$  min y coniferol con  $t_R= 46,6$  min. La identificación tentativa de los compuestos registrados se estableció con base en sus espectros de masas, usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NISTO5.

### 3.2.2 Determinación por HPLC acoplada a masas

La identificación de los fenoles, se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en el numeral 2.4.

La identificación de los fenoles en las muestras de aguas residuales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma, se realizó por comparación de los

tiempos de retención de los analitos, con los tiempos de retención de las respectivas sustancias de referencia, y por comparación de los espectros de masas y el patrón de fragmentación observados, con los espectros reportados en la literatura obtenidos bajo condiciones de análisis similares.<sup>53</sup>

Las condiciones de análisis empleadas para este estudio son descritas en las Tabla 12 y Tabla 13.

**Tabla 12.** Condiciones de análisis por HPLC.

PARAMETRO	CONDICIÓN
Fase móvil	Ácido acético al 1,25% - Metanol
Flujo	1,5 ml/min
Volumen de muestra	25 µL
Tiempo de análisis	30 min
Fase estacionaria	C18 Octadecilsiloxano

**Tabla 13.** Condiciones de análisis por Masas.

PARAMETRO	CONDICIÓN
Voltaje del capilar	4500 V
Gas de arrastre	Nitrógeno gaseoso
Flujo	5,0 L/min.
Presión	8 psi
Temperatura	300°C

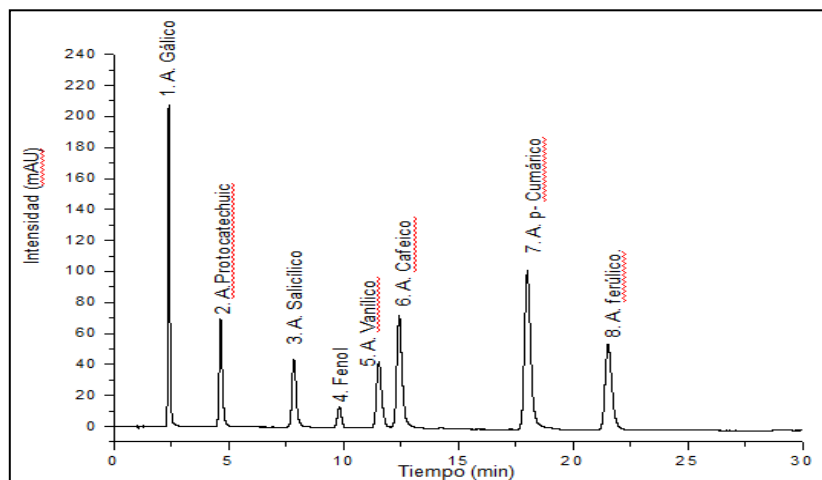
Para la determinación de los tiempos de retención de las diferentes sustancias, se preparó un patrón de 5000mg/L de una combinación de fenoles y se analizó por HPLC/MASAS (ver Figura 14 y Tablas 14 y 15).

**Tabla 14.** Datos curvas de Calibración HPLC.

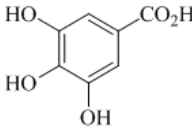
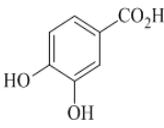
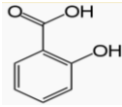
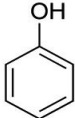
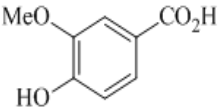
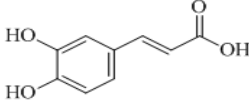
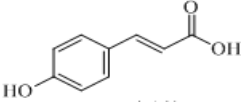
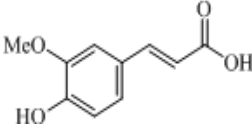
	A. Gálico	Ac. Protocatechuic	A. Salicílico	A. Vanílico
<b>Concentración mg/L</b>	<b>AREA (MAU)</b>			
2	205.78	115.68	110.68	158.29
5	1028.06	585.17	506.69	614.9
10	2180.62	1274.62	1103.12	1271.74
100	20048.54	11584.04	9859.19	11644.38
1000	...	111567.97	90298.56	113264.8
2000	...	225218.26	177592.95	231512.35
Ecuación	$Y=217X-423.46$	$Y=112.41X-7.42$	$Y=88.857x+417.57$	$Y=115.38X-197.14$
$R^2$	0.9998	1	0.9999	0.9999

	A. Cafeico	A. Para-Cumárico	A. Ferúlico
<b>Concentración mg/L</b>	<b>AREA (MAU)</b>		
2	252.77	314.9	162.76
5	1054.29	1603.94	1022.47
10	2190.64	3595.66	2155.41
100	20808.53	33763.86	19959.95
1000	199062.85	308009.48	193594.91
2000	402622.72	....	393784.27
Ecuación	$Y=200.9X-34.484$	$Y=307.45X+772.47$	$Y=196.39X-246.14$
$R^2$	1	0.9999	0.9999

**Figura 14** Cromatogramas de los patrones de fenoles por HPLC



**Tabla 15.** Fórmula Química de los compuestos fenólicos

NOMBRE DEL FENOL	FORMULA QUIMICA
Acido gálico	
Ácido protocatechuic	
Ácido salicílico	
fenol	
Ácido vanílico	
Ácido cafeico	
Ácido p- cumárico	
Ácido ferúlico	

En la Tabla 16 Se encuentran los tiempos de retención para los diferentes fenoles estudiados, empleando cada una de las metodologías implementadas anteriormente. Los tiempos de retención permiten observar la diferencia en el

orden de elución debido a las diferentes características de la fase estacionaria de la columna.

**Tabla 16** Tiempos de retención de los analitos

Nº Pico	Analito	Tiempo de retención (tR), min
1	A. Gálico	2,5125 ± 0,035
2	A. Protocatechuic	4,72 ± 0,272
3	A. Salicílico	7,9 ± 0,325
4	A. Fenol	8,78 ± 0,176
5	A. Vanílico	11,21 ± 0,339
6	A. Cafeico	11,99 ± 0,375
7	A. P-Cumárico	17,56 ± 0,287
8	A. ferúlico	21,13 ± 0,485

Una vez se establecieron las condiciones de análisis, se procedió a determinar las figuras analíticas de merito (Tabla 17), según se indicó en el numeral 2.4.2.3.

**Tabla 17.** Figuras analíticas de mérito para la metodología implementada.

Analito	A. Gálico	A. Protocatechuic	A. Salicílico
Ecuación	$Y = 200,6X - 4,178$	$Y = 112,41X - 7,42$	$Y = 88,857X + 417,57$
R <sup>2</sup>	0,999	1	0,9999
Pendiente	200,6	112,41	88,857
%CV (n=5)	1,39	5,75	4,11
Rango de linealidad mg/L	2 a 500	2 a 2000	2 a 2000
L mite de detección mg/L	0,002	0,022	0,033
Límite de cuantificación mg/L	0,002	0,024	0,037
Analito	fenol	A. Vanílico	A. caféico
Ecuación	$Y = 27,56X + 80,991$	$Y = 115,38X - 197,14$	$Y = 200,9X - 34,484$
R2	0,9997	0,9999	1
Pendiente	27,56	115,38	200,9
%CV (n=5)	3,02	3,13	1,63
Rango de linealidad mg/L	5 a 1000	2 a 2000	2 a 2000
Límite de detección mg/L	0,057	0,026	0,017
Límite de cuantificación mg/L	0,064	0,029	0,019

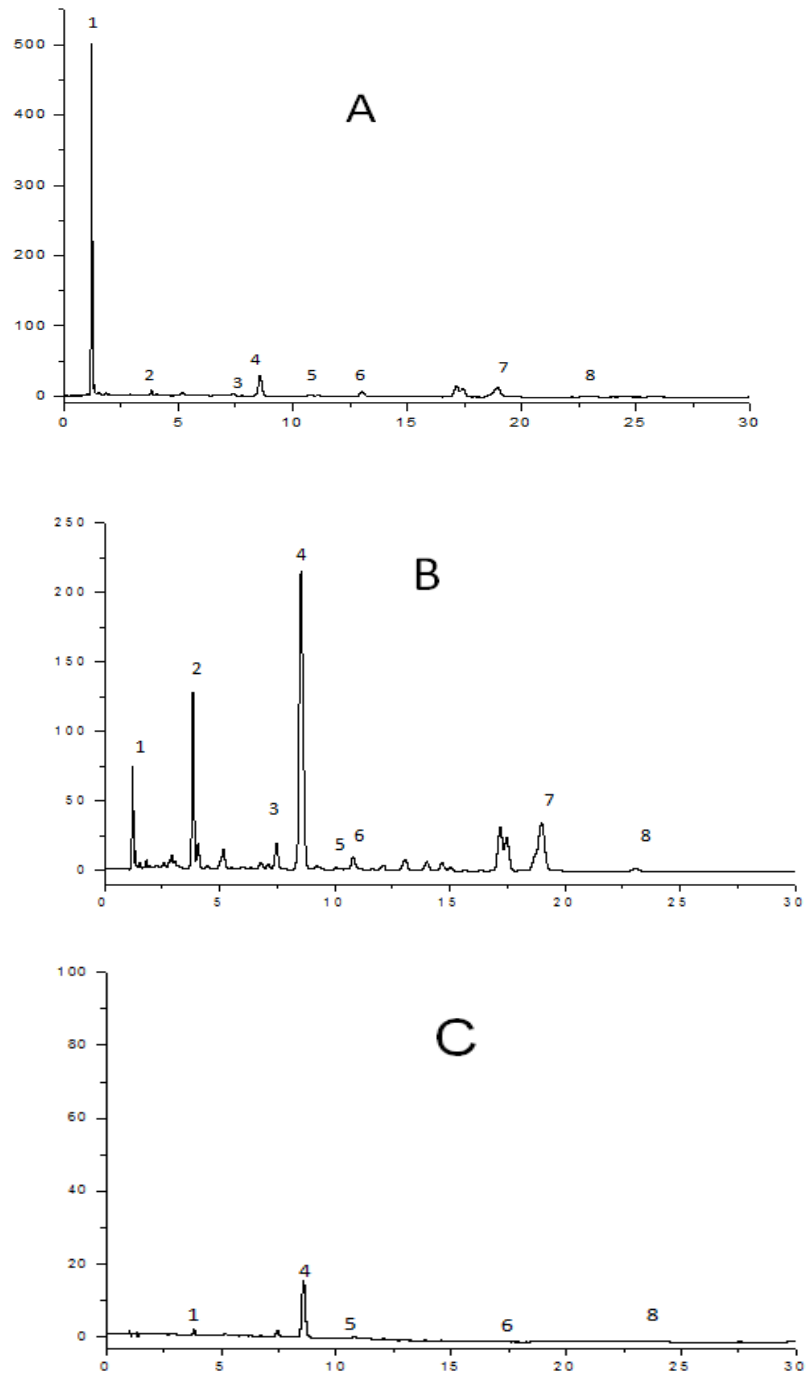
Analito	A. Cumárico	A. ferúlico
Ecuación	$Y = 307,45X + 772,47$	$Y = 196,39X - 246,14$
R <sup>2</sup>	0,9999	0,9999
Pendiente	307,45	196,39
%CV (n=5)	2,30	2,00
Rango de linealidad mg/L	2 a 1000	2 a 2000
Límite de detección mg/L	0,008	0,022
Límite de cuantificación mg/L	0,009	0,025

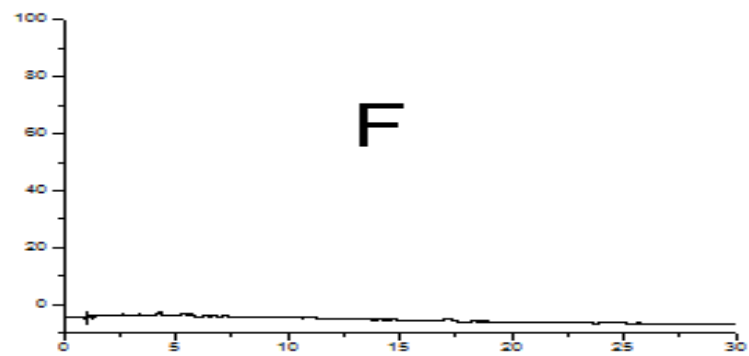
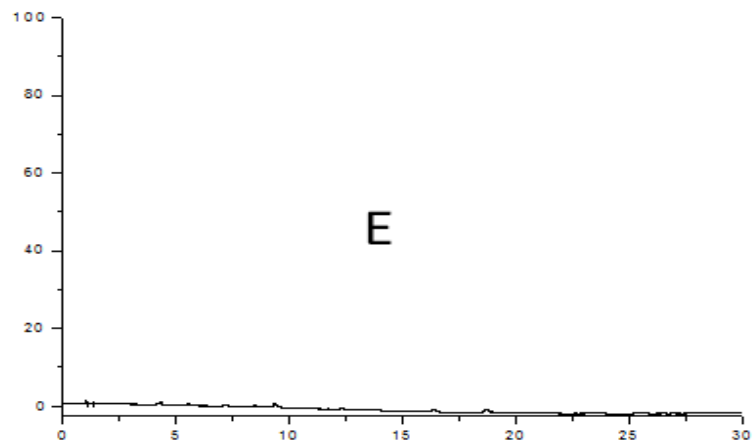
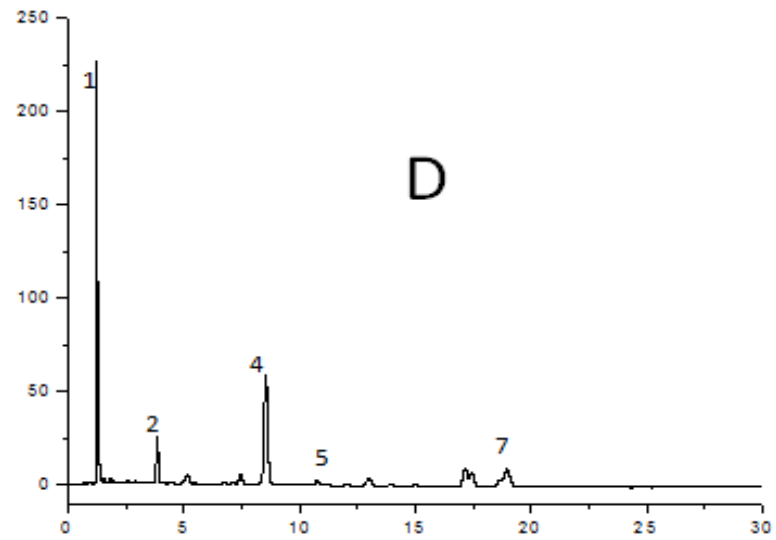
Los resultados reportados en la Tabla 17, indican que las metodologías implementadas presentan una buena linealidad, representada por el cuadrado del coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>). En cuanto a la sensibilidad, las pendientes de las curvas de calibración, demuestran que el detector empleado es sensible a pequeños cambios en la concentración de todos los analitos, en el rango de concentraciones evaluado. Respecto a la repetibilidad para cada una de las metodologías implementadas es aceptable, ya que el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) de los tiempos de retención, y las áreas de cada analito son inferiores al 2% y 10%, respectivamente, tal como lo recomiendan las Buenas Prácticas de Laboratorio.<sup>54</sup>

La Figura 15, muestra los perfiles cromatográficos representativos de las muestras de aguas residuales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma, obtenidos empleando una columna Zorbax C18.

Se observa que los tiempos de retención de los picos encontrados en los extractos de las muestras, coinciden con los tiempos de retención de las sustancias de referencia (Tabla 16). La adición de una concentración conocida de los fenoles de referencia a los extractos, produce un aumento en la señal del detector en estos mismos picos, lo cual hace suponer que corresponden a las mismas sustancias.

**Figura 15.** Determinación del contenido fenólico en las aguas residuales provenientes de las diferentes etapas del proceso de extracción del aceite de palma africana. A: Salida Condensados, B: Salida centrífuga, C: Salida Hidrociclón, D: Entrada PTAR, E: Salida anaerobia, F: Salida facultativas.





En la figura anterior se observa que los tiempos de retención de los picos 1 al 8, encontrados en los extractos de la muestras de aguas residuales, coinciden con los tiempos de retención de las sustancias de referencia (Tabla 16). La adición de

una concentración conocida de los fenoles de referencia a los extractos, produce un aumento en la señal del detector en estos mismos picos, lo cual nos da seguridad de que corresponde a las mismas sustancias.

**Tabla 18.** Concentración de los diferentes fenoles encontradas en las muestras, determinados por HPLC-MASAS

Fenol	Entrada PTAR	Hidrociclón	Salida Centrífuga	Salida Condensados
A. Gálico (mg/L)	1,36	0,67	2,45	1,97
A. Protocatechuic (mg/L)	0,85	...	2,11	0,78
A. Salicílico (mg/L)	...	...	31,72	4,87
Fenol (mg/L)	378,57	46,06	1055,62	334,94
A. Vanílico (mg/L)	6,70	2,06	12,85	8,70
A. Cafeico (mg/L)	...	0,58	2,90	2,03
P-Cumárico (mg/L)	0,03	...	3,38	4,63
Ferúlico (mg/L)	3,28	1,92	5,21	5,61

... (No se detectó)

En la muestra Hidrociclón, la concentración de los ácidos protocatechuic, salicílico y p-cumárico se encontró por debajo de los límites de detección, por lo tanto no fue identificada.

A la entrada de la PTAR, no se detectaron los ácidos: salicílico y p-cumárico.

En las muestras salida anaerobia y salida facultativas, las concentraciones de los fenoles analizados fueron muy bajas, impidiendo así su detección.

El fenol se encontró en todos los puntos de muestreo y presentó las mayores concentraciones (ver Tabla 18).

En la Figura 12. se presentan los espectros de masas de los compuestos fenólicos identificados por cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas, en los extractos de las aguas residuales del proceso.

En general, las relaciones m/z observadas en los espectros corresponden al patrón de fragmentación de los fenoles reportados en la literatura<sup>55</sup>.

Los datos obtenidos por MS/MS de los compuestos fenólicos son reportados en la Tabla 19 y Figura 16.

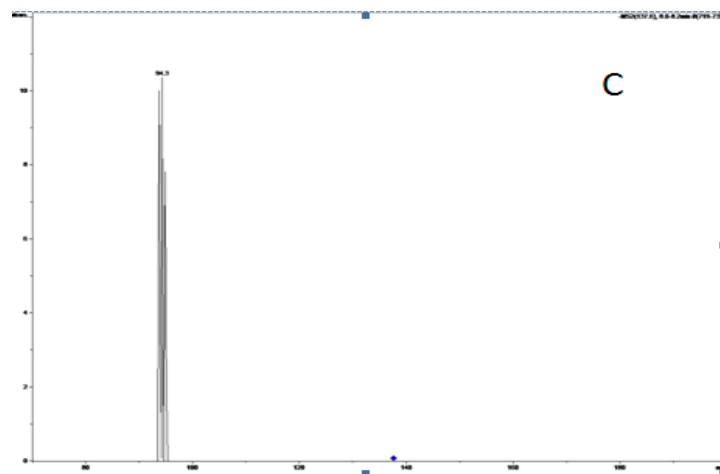
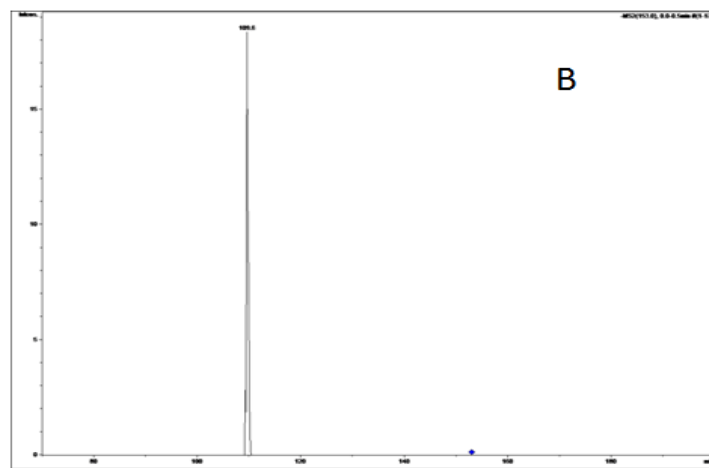
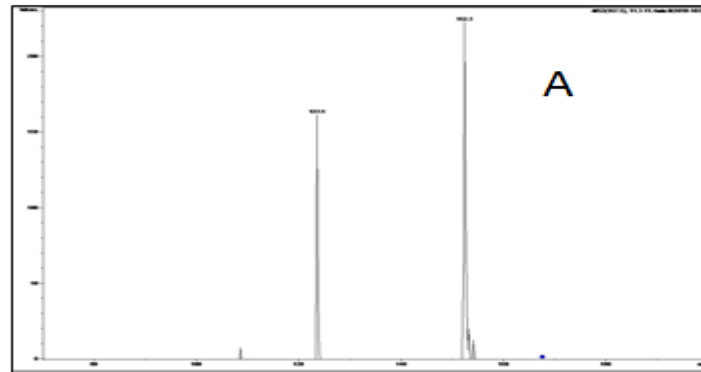
**Tabla 19.** Datos de los fenoles obtenidos por MS/MS

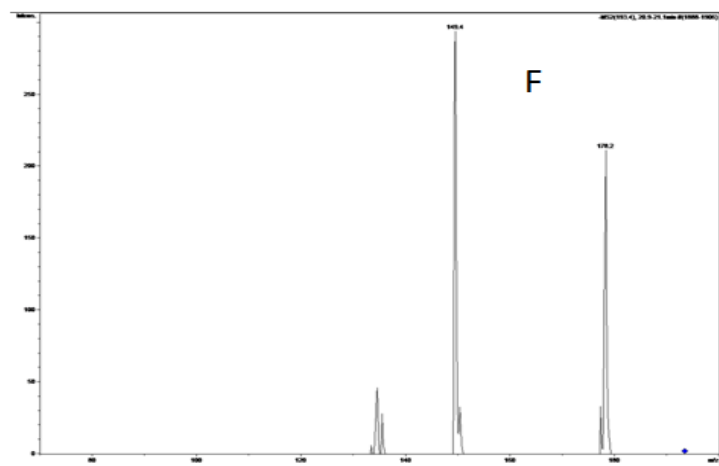
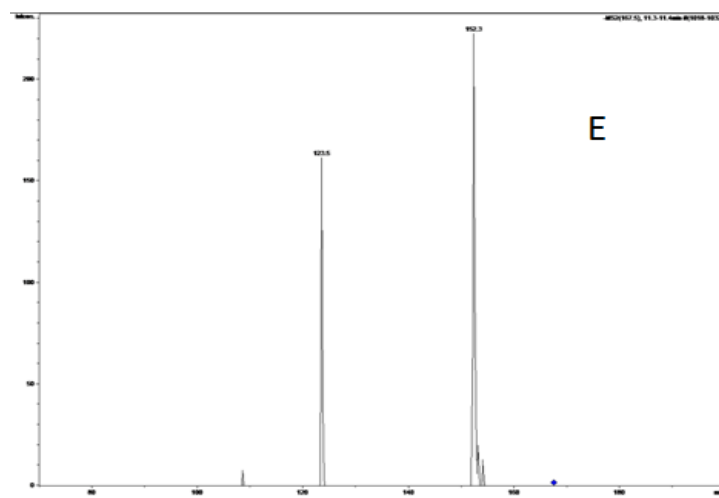
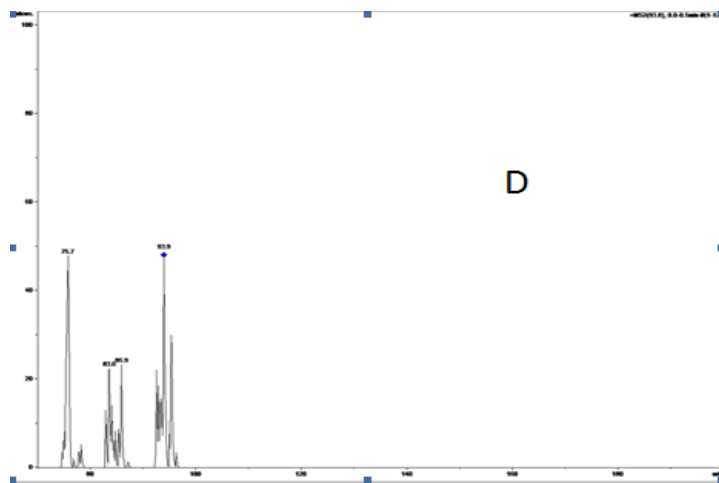
Analito	Tiempo de retención (min)	MS, m/z (M-H)	MS/MS, m/z (M-COO)	MS/MS, m/z (M-H <sub>2</sub> O)
A. Gálico	2,51	169	125,5	...
A. Protocatechuic	4,72	153	109,6	...
A. Salicílico	7,9	137,6	94,3	...
Fenol	8,78	...	...	75
A. Vanílico	11,21	167,5	123,5	...
A. caféico	11,99	179,3	135,4	...
A. Cumárico	17,56	163,4	119,6	...
A. ferúlico	21,13	193,4	149,4	...

El pico base obtenido para todos los ácidos fenólicos analizados usando MS/MS en el modo negativo es (M-H-COO), el cual se formó por la eliminación de un grupo carboxilo (-44) por la desprotonación de los fenoles, después de la disociación inducida por la colisión.<sup>56</sup>

En el caso del fenol, se encontró que presentó una pérdida de agua.

**Figura 16.** espectros de masas de los compuestos fenólicos identificados por cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas, en los extractos de las aguas residuales del proceso. A. a.Gálico, B: a. Protocatechuic, C: a. Salicílico, D: Fenol, E: a. Vanílico, F: a. Caféico.





## 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Determinación del contenido de fenoles totales

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se encontró que la concentración de fenoles totales presentes en las aguas residuales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma africana, supera los límites permisibles para el control de sustancias de interés sanitario, contempladas en el decreto 1594 de 1984, debido a que reportaron concentraciones superiores a 0,2 mg/L de Fenol, mediante el método colorimétrico 5530 B-D del Standard Methods edición 22 del 2012.

Las mayores concentraciones fueron encontradas a las salidas de los condensados 5,65 mg/L Fenol y de la centrifuga 4,78 mg/L Fenol (ver Tablas 4 y 5).

En la etapa de esterilización, al fruto se le adicionó vapor de agua a diferentes presiones, que eventualmente se convirtió en residual y que se analizó en este estudio en este estudio como salida de los condensados. En esta etapa no hay adición de reactivos que contengan o produzcan fenoles, lo que demuestra que los fenoles provienen del fruto tal y como ha sido reportado anteriormente en la literatura. Estos compuestos actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta.<sup>57</sup>

En la etapa de centrifugación al igual que en la etapa de esterilización, no se adicionaron sustancias con contenidos fenólicos y sin embargo, se encontraron concentraciones altas en fenoles, provenientes de los procesos anteriores.

Las aguas residuales generadas en el Hidrociclón, provienen de los residuos de torta prensada que en su turno es un desecho en el proceso de extracción del

aceite de palma. El Hidrociclón separa la nuez de la fibra para obtener a partir de ésta, el aceite de palmiste. En este proceso se genera un desecho líquido, en el cual se encontraron fenoles, en concentraciones inferiores a los desechos de los condensados y de la centrífuga.

Las aguas de los condensados, la centrífuga y el Hidrociclón se llevan, hasta la entrada a la PTAR. La concentración de fenoles en este punto fue alta debido a que allí confluyen los efluentes de todo el proceso.

Por otra parte, a la salida de la laguna anaerobia y de las lagunas facultativas, se encontraron fenoles, pero en menor concentración que en los otros puntos.

#### **4.2 Identificación y cuantificación del contenido de fenoles totales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma africana.**

En la identificación tentativa por GC-MS no se evidenció la presencia de los fenoles 2- Nitrofenol, 2- Clorofenol, O- cresol, 2,4 -diclorofenol, 2,4,6-Triclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, los cuales son tóxicos a concentraciones por debajo de los  $\mu\text{g/L}$  y también son persistentes (57), pero si se encontró fenol (1,6%), vinilguaiacol(0,4%), Trimetoxifenol (0,4%) y Siringaldehido (0,5%) que son menos tóxicos.

En la determinación de fenoles totales por GC-MS de los puntos entrada PTAR y salida facultativas, no se encontraron los fenoles, 2- Nitrofenol, 2- Clorofenol, O- cresol, 2,4 -diclorofenol, 2,4,6-Triclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, pero si se encontró a la entrada de la PTAR  $62,5 \mu\text{g/L}$  de fenol y a la salida de las facultativas  $0,5 \mu\text{g/L}$  de fenol, lo cual demuestra que la planta de tratamiento de agua residual, remueve un 99,2% en fenol.

Adicionalmente en el extracto de la entrada PTAR se identificó metil fenol, etilfenol, etilmetoxifenol, metoxivinilfenol, etilcatecol, hidroxibencenoetanol, vanillol,

ácido hidroxibenzóico, ácido hidroximetoxibenzoacético, siringaldehído, ácido hidroximetoxibenzenopropanóico, y coniferol que son fenoles naturales de tipo polifenol.

El análisis de los ácidos fenólicos por HPLC en los extractos de las aguas residuales generadas en las diferentes etapas del proceso de extracción del aceite de palma africana, mostraron la presencia de los ácidos: Gálico, Protocatechuic, Salicílico, Vanílico, Cafeico, Cumárico, Ferúlico y del Fenol, en cada uno de los puntos analizados.

Las mayores concentraciones de los diferentes fenoles encontradas en los extractos, se presentaron en los puntos Salida condensados y Salida Centrífuga, al igual que en estos puntos se identificaron todos los fenoles analizados.

En la muestra Hidrociclón, la concentración de los ácidos protocatechuic, salicílico y p-cumárico se encontró por debajo de los límites de detección, por lo tanto no fue identificada.

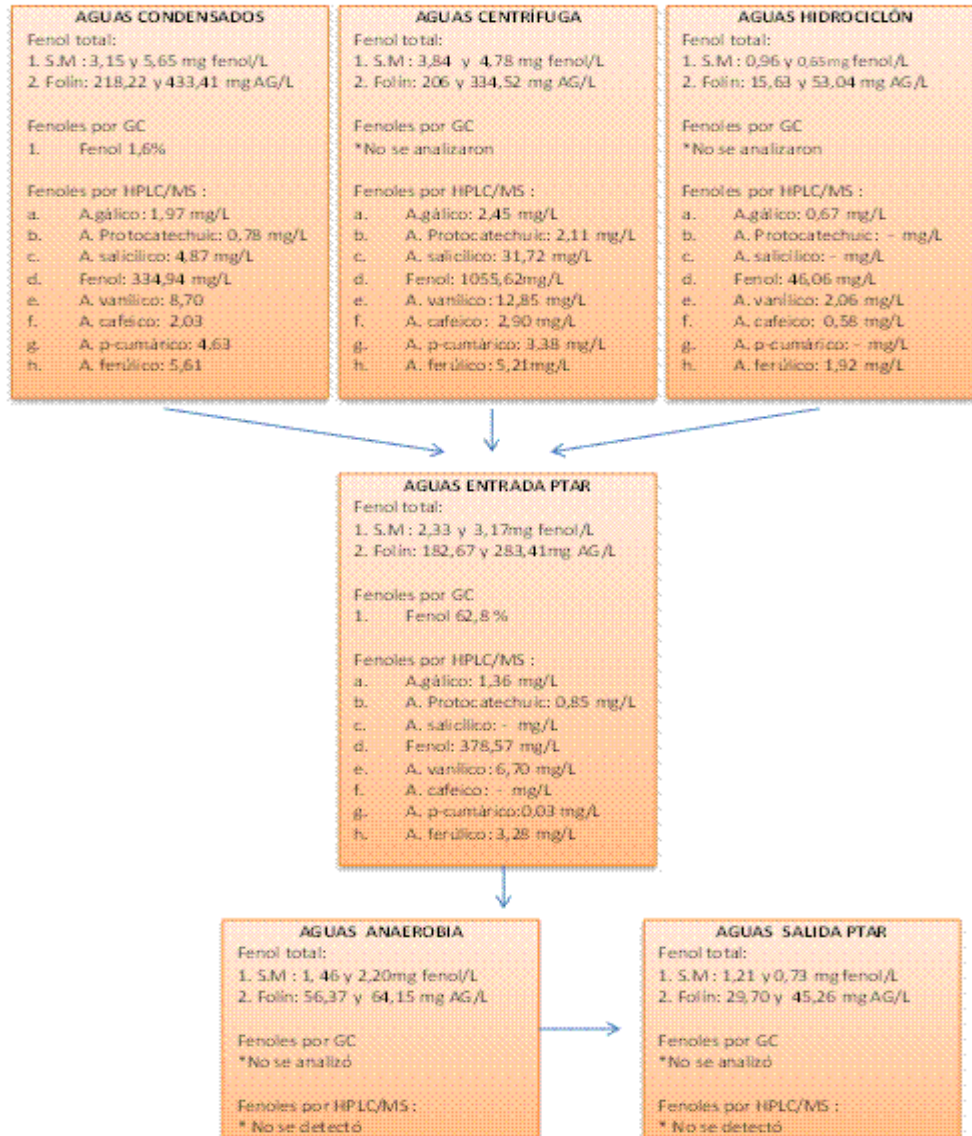
A la entrada de la PTAR, no se detectaron los ácidos: Salicílico y p- Cumárico.

En las muestras salida anaerobia y salida facultativas, las concentraciones de los compuestos fenólicos analizados fueron muy bajas, impidiendo así su detección.

El fenol se encontró en todos los puntos de muestreo y presentó las mayores concentraciones (ver Tabla 18).

Los resultados obtenidos por MS/MS, soportan los análisis realizados por HPLC, ya que se confirmó la presencia de estos ácidos fenólicos en las aguas residuales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma africana.

**Figura 17.** Datos de fenoles obtenidos en las aguas residuales generadas a lo largo del proceso de extracción del aceite de palma africana.



- Se evidenció que en todas las muestras analizadas de las diferentes etapas del proceso, presentaron valores de fenoles totales superiores a los límites permisibles por la norma de vertimientos Colombiana (0,2 mg/L); lo cual indica que el sistema de tratamiento de aguas residuales no alcanza

a remover la carga contaminante que es generada en el proceso industrial, logrando solamente un 68,49% de remoción en concentración.

- Se observó que aunque las concentraciones encontradas de los fenoles totales por el método colorimétrico y por la técnica del Folin- Ciocalteau no son comparativas por reportarse en diferentes unidades, las dos se pueden utilizar en la determinación de estos fenoles, ya que los resultados presentaron la misma tendencia.
- Por cromatografía de gases se pudo establecer que los compuestos fenólicos provenientes de las aguas residuales de los puntos salida de condensados, entrada PTAR y salida de las facultativas, no son del tipo clorofenoles, los cuales son tóxicos a concentraciones por debajo de  $\mu\text{g/L}$  y también son persistentes en los cuerpos hídricos; sino que son de tipo natural y tienen excelentes propiedades como antioxidantes, trampas de radicales libres y agentes quelantes de cationes divalentes.
- Las mayores concentraciones en fenoles total encontradas por los métodos colorimétrico y Folin – Ciocalteau, fueron en los puntos salida condensados y salida centrífugas, lo cual se corroboró por el método HPLC, ya que en los únicos puntos donde se evidenció la presencia de todos los fenoles analizados, alcanzando las mayores concentraciones fueron en éstos.
- Por HPLC se evidenció que las concentraciones de los diferentes fenoles analizados a la salida de las lagunas anaerobia y facultativa se encontraron por debajo de los límites de detección del método, lo cual impidió su cuantificación.
- Los resultados obtenidos por MS/MS, soportan los análisis realizados por HPLC, ya que se confirmó la presencia de estos ácidos fenólicos en las

aguas residuales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma africana.

## 5 CONCLUSIONES

- Se evidenció que en todas las muestras analizadas de las diferentes etapas del proceso, presentaron valores de fenoles totales superiores a los límites permisibles por la norma de vertimientos Colombiana (0,2 mg/L); lo cual indica que el sistema de tratamiento de aguas residuales no alcanza a remover la carga contaminante que es generada en el proceso industrial, logrando solamente un 68,49% de remoción en concentración.
- Se observó que aunque las concentraciones encontradas de los fenoles totales por el método colorimétrico y por la técnica del Folin- Ciocalteau no son comparativas por reportarse en diferentes unidades, las dos se pueden utilizar en la determinación de estos fenoles, ya que los resultados presentaron la misma tendencia.
- Por cromatografía de gases se pudo establecer que los compuestos fenólicos provenientes de las aguas residuales de los puntos salida de condensados, entrada PTAR y salida de las facultativas, no son del tipo clorofenoles, los cuales son tóxicos a concentraciones por debajo de  $\mu\text{g/L}$  y también son persistentes en los cuerpos hídricos; sino que son de tipo natural y tienen excelentes propiedades como antioxidantes, trampas de radicales libres y agentes quelantes de cationes divalentes.
- Las mayores concentraciones en fenoles total encontradas por los métodos colorimétrico y Folin – Ciocalteau, fueron en los puntos salida condensados y salida centrífugas, lo cual se corroboró por el método HPLC, ya que en los únicos puntos donde se evidenció la presencia de todos los fenoles analizados, alcanzando las mayores concentraciones fueron en éstos.
- Por HPLC se evidenció que las concentraciones de los diferentes fenoles analizados a la salida de las lagunas anaerobia y facultativa se encontraron

por debajo de los límites de detección del método, lo cual impidió su cuantificación.

- Los resultados obtenidos por MS/MS, soportan los análisis realizados por HPLC, ya que se confirmó la presencia de estos ácidos fenólicos en las aguas residuales provenientes del proceso de extracción del aceite de palma africana.

## 6 RECOMENDACIONES

- Se propone construir y poner en funcionamiento un proceso de biodegradación de fenoles, adicional a las operaciones con que cuenta la planta de agua residual, con el fin de reducir la contaminación a los límites permisibles por la normatividad Colombiana, evitando con ésto no incurrir en sanciones por parte de la autoridad ambiental que pueda afectar el permiso de vertimientos con que cuenta la compañía.

## BIBLIOGRAFIA

ALMAJANO, P. Determinación de la Actividad Antioxidante de las Bayas de Goji. Consorci Escola Industrial de Barcelona (CEIB). 2009. [35, 37, 39]

BAHARUDDIN et al. Characteristics and Microbial Succession in Co- Composting of Oil Palm Empty Fruit Bunch and Partially Treated Palm Oil Mill Effluent. The Open Biotechnology Journal. 2009, 3, 87-95. [24]

CADENA CALA, Tatiana ; HERRERA ARDILA, Yenny, Mayerly ; Evaluación Del Efecto Del Procesamiento Del Cacao Sobre El Contenido De Polifenoles Y Su Actividad Antioxidante; Universidad Industrial de Santander, 2008. [57]

CALLE AZNAR Silvia, Determinación Analítica de la Cafeína en Diferentes Productos Comerciales. Barcelona. Universidad Politécnica de Cataluña. 2011.[47]

DÍAZ ALTAMIRA. Degradación de Fenoles totales Mediante Reactores SBR en Aguas de Producción Petrolera. Venezuela. Universidad del Zulia. Escuela de Ingeniería Civil. 2011. [44]

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insight into the Applications of Palm Oil Mill Effluent: A Renewable Utilization of the Industrial Agricultural Waste, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, 14, 1445-1452. [8, 29]

GILALA Joseph. Determination of Phenols in Water by High Performance Liquid Chromatography with a UV- Detector, Central Ostrobothnia. University of applied sciences. 2010. [46]

GUTIÉRREZ, Dora. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. México, Simposio de Metrología. Op. Cit. 2008. [31, 33, 36, 38, 42]

IGWE, J.C., ONYEBADO C.C. A review of Palm Oil Mill Effluent (POME) Water Treatment. Journal of Environmental Research. **2007**, 1, 54-62. [19]

JAMAL et al. Effects of Physicochemical Parameters on the Production of Phenolic Acids from Palm Oil Mill Effluent Under Liquid-State Fermentation by *Aspergillus Niger* IBS-103ZA. Food Chemistry. 2011, 124, 1595-1602. [5]

JIANG, W.; Good laboratory practice in analytical laboratory. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 2005, 1(2), pp. 93 – 94. [54]

MINGORANCE, F. El Flujo del Aceite de Palma- Acercamiento desde una Perspectiva de Derechos Humanos. Bélgica/Europa, Edition. 1. 2006. [13]

MINISTERIO DE AGRICULTURA COLOMBIA. Decreto 1594 por medio del cual se reglamenta el uso del agua y de los vertimientos líquidos, 26 de junio de 1984, 1-138. [32]

MOHAMMAD et al. Effective Composting Oil Palm Industrial Waste by Filamentous Fungi: A Review, Resources. Conservation and Recycling. Op. Cit. 2012, 58, 69-78. [2, 6]

MOLINA, S. J. Estandarización de Métodos Analíticos para la determinación de Nitratos, Nitritos, compuestos fenólicos y, aceites y grasas utilizados como indicadores de contaminación en aguas naturales y residuales industriales. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Físicoquímicas. Escuela de Química. 2010. [4, 45]

ORTEGA, Sergio Camilo. Conservación Internacional y The Nature Conservancy. Reconocimiento de los Servicios Ambientales: Una Oportunidad para la Gestión de los Recursos Naturales en Colombia Bogotá, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 2008. [11, 34]

RUEDA RUEDA, Hugo. Evaluación del tiempo postcosecha sobre la actividad lipásica del mesocarpio del fruto de la palma de aceite y la calidad del aceite. Bucaramanaga, Universidad Industrial de Santander ,Escuela de Química, **2011**. [15]

RUPANI et al. Review of Current Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment Methods: Vermicomposting as a Sustainable Practice. World Applied Sciences Journal. **2010**, 10, 1190-1201. [27]

SAMBANTHAMURTHI et al. Oil Palm Vegetation Liquor: A New Source of Phenolic Bioactives. Journal of Nutrition. **2011**. 1-9. [41]

SERNA, Iveth. Recuperación de Fenol de Aguas Residuales por Tratamiento con NaCl. Revista de la Facultad de Minas. Medellín. Universidad Nacional. 2003. [43]

SINGH et al. Composting of Waste from Palm Oil Mill: A Sustainable Waste Management Practice, Environ Sci Biotechnol. 2010, 9, 331-344. [23, 28]

SINGH et al. Management of Biomass Residues Generated from Palm Oil Mill: Vermicomposting a Sustainable Option Resources. Conservation and Recycling. Op. Cit. 2011, 55, 423-434. [3, 7]

SKOOG, Douglas. A, WEST M. Donald, HOLLER, James F, CROUCH R. Stanley; Fundamentos de Química Analítica, edición no.8. editorial Thomson, 2005. [48, 50]

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association, American Water works Association, water environment Federation, 22 ed. Washington, 2012. [52]

SULAIMAN, F.; ABDULLAH, N.; GERHAUSER, H.; SHARIFF, A. An Outlook of Malaysian Energy, Oil Palm Industry and its Utilization of W as Useful Resources. ScienceDirect. Op. Cit. 2011, 35, 3775-3786. [26, 30]

URIBE SANTOS; Gustavo Adolfo; Análisis teórico-práctico de extracción de aceite crudo de palma en la planta de beneficio de Palmas del Cesar S.A., ubicada en el corregimiento de Minas, sur del Cesar. Universidad Industrial de Santander, 2011. [53]

VIJAYARAGHAVAN et al. Aerobic treatment of palm oil mill effluent, Journal of environmental Management. 2007,82, 24-31. [21]

WU et al. A holistic Approach to Managing Palm Oil Mill Effluent (POME): Biotechnological Advances in the Sustainable Reuse of POME. Biotechnology Advances. 2009, 27, 40-52. [1, 9, 20, 40]

WU et al. Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end – of – pipe processes. Journal of Environmental Management. 2010, 91, 1467-1490. [10]

WU et al. Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment and Bioresources Recovery Using Ultrafiltration Membrane: Effect of Pressure on Membrane Fouling, Biochemical Engineering Journal. 2007, 35, 309-317. [16, 18]

YUN-PING, Neo; AZIS, Ariffin; CHIN- PING, Tan Yew-Ai, Tan; Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. *Food Chemistry*. 2010, 353-359. [55, 56]

[www.bioenergyconsult.com/introduction-to-pome/](http://www.bioenergyconsult.com/introduction-to-pome/). 2012. [17, 25]

[www.bucarelia.com.co/](http://www.bucarelia.com.co/) annual report. 2012. [14]

[www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/library/AE620s/Pfrescos/PALMAD EACEITE.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/library/AE620s/Pfrescos/PALMAD EACEITE.HTM). 2012. [22]

[www.fedelpalma.org/](http://www.fedelpalma.org/) .annual report. 2012. [12]

[www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria\\_de\\_masas.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf) 2013. [51]

[www.4.ujaen.es/~mjayora/docencia\\_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf](http://www.4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf). 2013 [49]