

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES, PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN CORTES DE
PERFORACIÓN DE SUELOS PETROLEROS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS
AMBIENTALES CHEMILAB S.A.S**

YULY ANNABELL ARTUNDUAGA NARVÁEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2015**

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES, PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN CORTES DE
PERFORACIÓN DE SUELOS PETROLEROS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS
AMBIENTALES CHEMILAB S.A.S**

YULY ANNABELL ARTUNDUAGA NARVÁEZ

**Proyecto de trabajo de grado en modalidad de pasantía
Requisito parcial para optar al título de Químico**

**DIRECTOR
M. Sc. ISABEL BRAVO REALPE
DIRECTORA GRUPO DE INVESTIGACION EN AGROQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2015**

Nota de Aceptación

Director _____
Isabel Bravo Realpe M.Sc.

Co. Director _____
Elíana Valencia M.Sc.

Jurado _____
Edier Humberto Pérez Ph. D.

Jurado _____
Rene Zúñiga Fajardo M.Sc

Fecha de sustentación: Popayán, 09 Marzo de 2015

DEDICATORIA

Hoy finalizo esta larga y valiosa etapa de mi vida, el ser una profesional en esta bella y hermosa carrera de la Química. Es mi más grande triunfo, que con esfuerzo y dedicación lo he podido alcanzar. Pero no hubiera sido posible culminarlo sin la mano bondadosa de mi Padre Santo, aquel que cuando me veía caminar sola me mostraba el camino de la luz. Es por este motivo que este triunfo va dedicado en primera instancia a mi creador celestial. ¡Honra y gloria tuya Señor!

Con mucha alegría en mi corazón, quiero que este título lo reciban con orgullo mis padres Carmenza Narváez y Armando Artunduaga, quienes con amor me han orientado y me han enseñado lo valioso que es luchar por mis sueños.

A Loren Artunduaga, mi hermanita querida, quien con sus oraciones me tenía en sintonía con Dios.

Finalizo con una pequeñita que es el motor de mi vida, aquella princesa que con su mirada me hace sentir viva, me brinda energía para poder proyectarme y sentirme la mujer más feliz del mundo. Este triunfo también es tuyo mi Hija adorada, Hilana Michelle Padilla Artunduaga, te amo y este es uno de los primeros triunfos que vamos a conseguir las dos de la mano de Dios. ¡

¡Mi princesa, vamos por más!

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi directora: M.Sc. Isabel Bravo Realpe, por ver en mí el potencial para llevar a cabo este proyecto. Quiero agradecerle por esa mano amiga que me brindo en cada etapa de este proceso y además por brindarme todos sus conocimientos y aquellas palabras alentadoras que me solía dar. Hoy me siento bendecida de que mi Dios la hubiera puesto en mi camino aquel día que sin pensarlo veía toda mi vida desmoronada.

A la Doctora M.Sc. Eliana Valencia por depositar toda su confianza en mí, por facilitarme con mucho amor todos los espacios y las herramientas en pro de este proyecto. Gracias, por cada palabra y cada enseñanza que usted me brindaba, la cual me hicieron crecer como persona y pulió mi vida profesional.

A mis profesores, por poner un granito de arena en mi formación académica y profesional. Gracias a aquellos profesores que con su vocación me hicieron amar con más fuerzas esta línea de las ciencias exactas, la Química.

A mis compañeros de la universidad, Carolina Castro, Jhina Bamburgüe, Marcela Martínez, Jeisson Cortés. Gracias por todos esos buenos y malos momentos que vivimos en situaciones diferentes de mi carrera profesional. Niños los quiero mucho.

Al personal del laboratorio ChemiLab S.A.S, por brindarme su ayuda y acogerme en esta hermosa familia.

A mi hermosa Universidad del Cauca, nunca me equivoqué en seleccionarla y hoy me siento orgullosa porque seré una egresada de una Universidad que genera impacto en la sociedad, con excelentes docentes de la más alta calidad. La cual me dio todas las herramientas académicas para ser una persona competitiva a nivel laboral y personal.

A mi familia por sus oraciones, por su apoyo y por ese orgullo que sienten por mí.

Finalmente quiero agradecer a todas y cada una de las personas que de una u otra manera fueron partícipes, creyeron en mí y me brindaron su colaboración desinteresadamente en la realización de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
4.1 NORMA INTERNACIONAL ISO/IEC 17025.....	15
4.2 ACREDITACIÓN.....	16
4.3 PROCESO DE VALIDACIÓN.....	16
4.4 FIGURAS IMPORTANTES DE MÉRITOS ANALÍTICOS.....	16
4.4.1 Exactitud.....	17
4.4.2 Precisión.....	17
4.4.3 Límite de detección (LOD).....	17
4.4.4 Límite de cuantificación (LOQ).....	18
4.4.5 Linealidad.....	18
4.4.6 Sensibilidad.....	19
4.4.7 Repetibilidad.....	19
4.4.8 Precisión intermedia.....	19
4.4.9 Incertidumbre.....	19
4.4.10 Robustez.....	23
4.5 SUELOS DE CORTES DE PERFORACIÓN PETROLERA.....	25
4.6 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's).....	25
4.6.1 Propiedades físicas y químicas de los HAP's.....	26
4.6.2 Toxicidad de los HAP's.....	26
4.6.3 Fuentes generadoras de HAP's.....	27
4.7 METODOS DE EXTRACCIÓN.....	27
4.7.1 Soxhlet.....	27
4.7.2 Ultrasonido.....	28
4.7.3 Extracción en fase sólida (SPE).....	29
4.8 METODO DE CUANTIFICACIÓN.....	29
4.8.1 Cromatografía de gases (CG).....	29

4.9	SISTEMA DE DETECCIÓN.....	30
4.9.1	Detector de ionización por llama FID.....	30
4.10	EFICIENCIA CROMATOGRÁFICA.....	31
5.	<i>METODOLOGÍA</i>	32
5.1	EQUIPOS Y REACTIVOS.....	32
5.2	CONSIDERACIONES PRINCIPALES.....	35
5.2.1	Lavado de material.....	35
5.2.2	Metodología de calibración del material usado en la validación	35
5.2.3	Preservación y estabilidad de la muestra	35
5.3	ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL.....	36
5.3.1	Perfil cromatográfico.....	36
5.3.2	Curvas de Van Deemter	36
5.3.3	Idoneidad del sistema cromatográfico	37
5.4	VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL.....	38
5.4.1	Parámetros Analíticos	38
5.5	VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HAP's.....	39
5.5.1	Procedimiento de extracción	39
5.5.2	Solvente de extracción	39
5.5.3	Limpieza	40
5.5.4	Efecto matriz	40
5.5.5	Muestras de validación en la metodología de HAP's en suelos de cortes de perforación (Ultrasonido, CG/FID).....	40
5.5.6	Robustez	43
5.5.7	Análisis estadístico de los resultados	44
6.	<i>RESULTADO Y ANÁLISIS</i>	44
6.1	IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL.....	44
6.1.1	Curvas Van Deemter	44
6.1.2	Idoneidad cromatográfica	47
6.1.3	Límites críticos	59
6.2	ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HAP's EN SUELOS DE CORTES DE PERFORACIÓN.....	62
6.2.1	Elección procedimiento de extracción	62
6.2.2	Elección solvente de extracción	63
6.2.3	Procedimiento de limpieza	65

6.2.4	Efecto matriz	66
6.3	VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HAP's EN SUELOS DE CORTES DE PERFORACIÓN.....	67
6.3.1	Lote de muestras utilizadas en la Validación del método para suelos de cortes de perforación.....	69
6.3.2	Estimación de la incertidumbre en la determinación de HAP's en suelos de cortes de perforación mediante la metodología de fuentes globales.....	70
6.3.3	Robustez	72
7.	CONCLUSIONES	75
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	77
	ANEXOS.....	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz diseño experimental de Placket y Burman para 7 variables.....	24
Tabla 2. Variables fijas y alteradas en el ensayo de Robustez.....	24
Tabla 3. Diferencia de medias de las variables en estudio.....	24
Tabla 4. Condiciones del automuestreador (ALS).....	41
Tabla 5. Rampa de temperaturas del horno del cromatógrafo de gases.....	42
Tabla 6. Variables utilizadas en el ensayo de robustez.....	43
Tabla 7. Matriz del diseño experimental utilizado en el ensayo de Robustez.....	43
Tabla 8. Resultados Van Deemter.....	45
Tabla 9. Criterios de aceptación para los parámetros cromatográficos.....	48
Tabla 10. Resultados de los parámetros cromatográfico.....	48
Tabla 11. Tiempos de retención de cada HAP's.....	49
Tabla 12. Resultados para la evaluación de la linealidad instrumental en la determinación de HAP's en suelos.....	49
Tabla 13. ANOVA de área para linealidad instrumental del método de HAP's por CG/FID en función del nivel de concentración.....	50
Tabla 14. ANOVA de área para linealidad instrumental del método de HAP's por CG/FID en función del día.....	51
Tabla 15. Evaluación de la linealidad instrumental experimentalmente.....	53
Tabla 16. Resultados obtenidos en la evaluación estadística del coeficiente de Correlación de Pearson.....	54
Tabla 17. Resultados obtenidos en la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto.....	55
Tabla 18. Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración.....	56
Tabla 19. Condiciones de repetitividad.....	57
Tabla 20. Curvas de calibración bajo condiciones de precisión intermedia.....	57
Tabla 21. Precisión instrumental bajo condiciones de repetitividad y precisión intermedia.....	58
Tabla 22. Cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).....	60
Tabla 23. Resultados para la determinación experimental de LOQ.....	61
Tabla 24. Porcentajes de recuperación obtenidos en los dos métodos de extracción de los HAP's en suelos.....	62
Tabla 25. Estadístico de Levene para la elección del procedimiento de extracción.....	63
Tabla 26. Porcentajes de recuperación en la prueba de afinidad del solvente.....	63
Tabla 27. Estadístico de Levene, elección de solvente.....	64
Tabla 28. Porcentajes de recuperación ensayo del procedimiento de limpieza.....	65
Tabla 29. Estadístico de Levene para el ensayo del procedimiento de limpieza.....	66
Tabla 30. Prueba de distribución t de student para la evaluación del efecto matriz en el suelo.....	67
Tabla 31. Exactitud y precisión del método.....	68
Tabla 32. Prueba de Levene (homogeneidad de varianzas) para los %R.....	68
Tabla 33. ANOVA para los porcentajes de recuperación.....	69
Tabla 34. Porcentajes de recuperación globales e intervalos de confianza.....	69
Tabla 35. Resultados de análisis del lote de muestras de la validación.....	70

Tabla 36. Incertidumbres del método para suelos de cortes de perforación.....	71
Tabla 37. Variables en el estudio de robustez en la determinación de HAP's en suelos.....	73
Tabla 38. Diseño Experimental de Placket y Burman para evaluar Robustez en la determinación de HAP's en suelos.....	73
Tabla 39. Recuperados Obtenidos en la Evaluación de la Robustez en la determinación de HAP's en suelos.....	74
Tabla 40. Efecto de cada factor sobre el recuperado en la determinación de HAP's en suelos.....	74
Anexo A, Tabla 1. Pruebas de normalidad aplicadas al área en función de la concentración.....	80
Anexo A, Tabla 2. Pruebas de normalidad de valores del área en función del día..	80
Anexo A, Tabla 3. Pruebas de normalidad para los %R de los niveles de concentración en las curvas de calibración.....	81
Anexo B, Prueba de Bonferroni (post hoc) del área en función del nivel de concentración del método de determinación de HAP's en suelos.....	82
Anexo C, Porcentajes de recuperación para las curvas de calibración.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	24
Figura 2. Equipo soxhlet.....	28
Figura 3. Equipo de extracción ultrasónica.....	28
Figura 4. Sistema cromatógrafo de gases.....	30
Figura 5. Diagrama detector de ionización por llama FID.....	31
Figura 6. Detector de ionización por llama FID.....	33
Figura 7. Cromatógrafo de gases.....	33
Figura 8. Evaporador rotatorio.....	34
Figura 9. Ultrasonido.....	34
Figura 10. Extracción en fase sólida (SPE).....	34
Figura 11. Gráfica de Van Deemter.....	37
Figura 12. Perfil Cromatográfico de los HAP's en estudio.....	44
Figura 13. Gráficas Van Deemter de HAP's.....	46
Figura. 14. Curvas de calibración bajo condiciones de precisión intermedia.....	52
Figura 15 Curvas de calibración para la determinación de límites críticos.....	59
Figura 16. Cuantificación de las fuentes de incertidumbre de los HAP's.....	71

RESUMEN

Este proyecto se desarrolló en convenio entre la Universidad del Cauca y el laboratorio de calidad ambiental ChemiLab S.A.S, dónde se implementaron y validaron las metodologías de los procesos analíticos para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en cortes generados por la industria petrolera en los procesos de perforación de suelos petroleros mediante la técnica de cromatografía de gases (CG) con detección de ionización por llama (FID) en las instalaciones de la empresa, con equipos, materiales y reactivos disponibles por el mismo. De ésta forma se logró contribuir en los primeros pasos en el proceso de acreditación en la norma ISO/IEC 17025 ante el IDEAM.

En primera instancia se realizaron comparaciones entre metodologías de extracción de HAP's en suelos como soxhlet y ultrasonido, encontrando recuperados del 70 al 130%, seleccionando la extracción ultrasónica la cual aportó recuperados mayores. De acuerdo al método escogido se probó la mejor mezcla de solvente para la extracción del suelo dónde la mezcla acetona/diclorometano 1:1 evidenció recuperados con diferencia significativa. Para mitigar interferencias en el extracto de suelo se utilizó la extracción en fase sólida como método de limpieza utilizando un soporte de Florisil (Fase normal). La efectividad del análisis y la capacidad inicial del laboratorio en el análisis de HAP's en muestras reales, fue demostrada evaluando el efecto matriz en muestras de suelo de cortes de perforación.

Finalmente teniendo condiciones de extracción, limpieza y cuantificación óptimas se validó la metodología para la determinación de Naftaleno, Fluoreno, Pireno, Antraceno y Fluoranteno, 5 de los 16 HAP's más importantes de la EPA, utilizando extracción ultrasónica y cuantificación mediante cromatografía de gases (CG/FID), método 3550C y 8100 respectivamente, de la norma EPA SW-846 en ChemiLab S.A.S.

De forma experimental se logró determinar los valores estadísticos que sirvieron como criterios de confianza y aceptación en la metodología utilizada, tales como: Precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, sensibilidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre y robustez. Todo lo anterior cumpliendo con los requisitos de la norma ISO/IEC 17025 y procedimientos del sistema de gestión de calidad del laboratorio.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22, para realizar el respectivo tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.

1. INTRODUCCIÓN

En diferentes procesos industriales se están generando residuos peligrosos, como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), producidos además por emisiones naturales, siendo fuentes importantes de contaminación de suelos y sedimentos. Muchos HAP's con alto peso molecular como el benzo[a]pireno causan efectos carcinogénicos y mutagénicos. Es por esto, que los riesgos causados por ellos, han generado preocupación a nivel mundial, expresada en legislaciones para controlarlos; resultando normas para el agua potable, alimentos, ambiente de trabajo, así como para los efluentes procedentes de fuentes industriales y móviles. La mayoría de los estudios se centran en los 16 HAP's de la lista de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica a benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno en el grupo de probable cancerígeno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno en el grupo de posibles carcinógenos, y el benzo [ghi] perileno como inclasificable en cuanto a la carcinogenicidad.

En la actualidad, el vertido y deposición de este tipo de residuos, genera contaminación, producida no sólo por su concentración total, sino por su disponibilidad. Los HAP's, están presentes en relativamente bajas concentraciones en la corteza terrestre; se encuentran en concentraciones que oscilan entre 1×10^{-3} y 10 mg.kg^{-1} , pero en zonas de actividad petrolera estos niveles se incrementan exponencialmente, dicho incumplimiento ha llevado a sanciones y multas a empresas colombianas, cuya peligrosidad es dada especialmente por la movilidad hacia aguas subterráneas o disponibilidad a partir del suelo, dependiente de su especiación y es afectada por diversos parámetros geo-edáficos. Por tanto, la caracterización, evaluación y remediación de los HAP's es uno de los principales retos ambientales por abordar actualmente.

La EPA, proporciona una metodología estándar, usada en muchos países, para analizar características tóxicas de HAP's en suelos y aguas, logrando determinar niveles de contaminación por Cromatografía de gases con detector de ionización por llama (GC/FID). La prueba simula la ruptura de agregados del suelo mediante una mezcla de solvente polar/apolar con extracción sucesiva en ultrasonido (EPA 3550C) y su posterior cuantificación por un método normalizado, donde se indican las condiciones cromatográficas previstas y necesarias (EPA 8100).

Con base en estas consideraciones se reitera la importancia de tener laboratorios en nuestro país que permitan obtener resultados confiables, necesarios para que las empresas productoras de estos residuos puedan gestionar tratamientos pertinentes para su desactivación principalmente en cortes de suelos petroleros.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo al IDEAM, en Colombia existe actualmente un laboratorio ambiental acreditado en el análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en la matriz suelos, mientras que la demanda por parte de usuarios de diferentes industrias generadoras de estos residuos es alta.

Diferentes factores del método suministrado por la EPA juegan un papel importante a la hora del montaje y proceso de validación del método, tales como: solvente de extracción, cantidad de muestra (suelo) y tiempo de extracción afectan significativamente los resultados de cuantificación de dichos compuestos, aumentando o disminuyendo los porcentajes de recuperación (%R), debido a la determinante interacción físico-química entre matriz y extractante. Por esta razón, en Colombia es determinante la necesidad de demostrar competencia técnica por parte de los laboratorios de calidad ambiental, a través de sistemas de acreditación del análisis con el IDEAM, bajo la norma ISO/IEC 17025. Se requiere la confirmación de la competencia analítica de todos los métodos implementados aun cuando estén normalizados (Standard Methods y EPA), siendo requisito para garantizar la confiabilidad de los resultados que permitan asegurar el cumplimiento de la normatividad cada vez más rigurosa, especialmente en compuestos de alta peligrosidad ambiental. ChemiLab S.A.S. se unió a esta necesidad deseando cumplir con el propósito de servicio a la industria en control de calidad ambiental como uno de los objetivos de calidad para la gestión de análisis cromatográficos, sin embargo, no tiene implementada ni validada la metodología para tal propósito, que le permitan determinar niveles permisibles por hidrocarburos aromáticos policíclicos y asesorar al usuario en el transcurso del análisis. Se hace necesario determinar los niveles de concentración permitidos por la EPA para HAP's, para analizar los resultados obtenidos en todo el proceso de extracción y cuantificación por cromatografía de gases, según los métodos SW-846 de la EPA, para contribuir al proceso de acreditación del método ante la norma respectiva.

Con este proyecto y el correspondiente convenio entre la Universidad del Cauca y el laboratorio ambiental ChemiLab S.A.S. se implementó y validó el método 3550C y 8100 de la EPA SW-846 para la determinación de 5 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos: Naftaleno, Fluoreno, Pireno, Antraceno y Fluoranteno en muestras de suelos, empleando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies, con detector de ionización por llama (FID) en las instalaciones del laboratorio, con los equipos, materiales, reactivos y asesoría disponibles en el mismo, contribuyendo así al proceso de acreditación ante el IDEAM.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar y validar el método 3550C y 8100 de la EPA SW-846 para la determinación y cuantificación de Naftaleno, Fluoreno, Pireno, Antraceno y Fluoranteno en suelos de cortes de perforación petrolera, mediante cromatografía de gases con detector de ionización por llama (CG/FID).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de cada hidrocarburo aromático policíclico en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies, modelo 7820 A con detector de ionización por llama (FID).
- Implementar el proceso óptimo de extracción ultrasónica EPA 3550C para Naftaleno, Fluoreno, Pireno, Antraceno y Fluoranteno en muestras de suelo.
- Validar la metodología 3550C y 8100 de la EPA SW-846 para cada uno de los HAP's, estableciendo los parámetros de exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límites de detección y cuantificación, sensibilidad, robustez e intervalo lineal.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 NORMA INTERNACIONAL ISO/IEC 17025

El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC es el organismo nacional de normalización, según el Decreto 2269 de 1993. El ICONTEC tiene como misión fundamental brindar soporte y desarrollo al productor y protección al consumidor. Colabora con el sector gubernamental y apoya al sector privado del país, para lograr ventajas competitivas en los mercados interno y externo.

La norma internacional ISO/IEC 17025 fue ratificada por el Consejo Directivo en 2005-10-26. Esta norma establece los requisitos generales para la competencia de laboratorios en la realización de muestreos, ensayos y calibraciones, que al cumplirlos se debe demostrar que funcionan con un sistema de calidad, que son técnicamente competentes y que están capacitados para generar resultados válidos y confiables.¹

Esta norma proporciona herramientas y la estructura para que el laboratorio pueda generar resultados confiables a sus usuarios mejorando su competitividad y productividad, además es empleada en los laboratorios cuando desarrollan sistemas de gestión de calidad para sus actividades administrativas y técnicas. Generalmente

es utilizada por usuarios del laboratorio, autoridades reglamentarias y los organismos de acreditación cuando confirman y reconocen la competencia de los laboratorios ²

4.2 ACREDITACIÓN

La acreditación es la norma establecida a escala internacional para generar confianza sobre la actuación de un tipo de organizaciones, que se denominan de manera general organismos de evaluación de la conformidad y que abarca a los laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, entidades de inspección, entidades de certificación y verificadores ambientales ². El proceso de acreditación de los ensayos de un laboratorio ante una organización como el IDEAM proporciona reconocimiento y mayor confianza a los servicios ofrecidos, garantizando la adopción de un sistema de gestión de calidad a todos sus procesos organizativos y además asegura su competencia técnica dando peso a los resultados emitidos por el laboratorio.

4.3 PROCESO DE VALIDACIÓN

La validación es la obtención de evidencia objetiva de un proceso por medio del cual se puede concluir que se cumplen requisitos parciales para ejecutar dicho proceso, puede incluir procedimientos de muestreo, manejo y transporte de muestras. ^{3,4}

La norma internacional ISO/IEC 17025, no establece el requerimiento de la validación de métodos normalizados aplicados en un laboratorio específico, pero sí establece la obtención de datos sobre el rendimiento de su propio uso, es decir que siempre resulta apropiado contar con ensayos de confirmación, incluso cuando se utilicen métodos normalizados ⁵.

Los métodos normalizados se pueden aplicar directamente obteniéndose resultados similares a los publicados en el método, pero es común que varíen los resultados esperados debido a condiciones particulares del laboratorio como los reactivos, los equipos, el analista y las condiciones ambientales, por tal motivo, se deben practicar las metodologías propuestas para verificar que su funcionamiento sea competitivamente aceptable y que el laboratorio tenga la envergadura requerida para cumplir el propósito requerido. El laboratorio ChemiLab S.A.S cuenta con un procedimiento "PGC" de validación de metodologías analíticas, que permiten establecer el grado de validación requerido de acuerdo con los servicios ofrecidos, con las políticas de calidad, con la naturaleza de los cambios realizados a un método validado o con las metas de calidad que se haya trazado como parte de los procesos de mejoramiento continuo del sistema de calidad, adicionalmente cuenta con un procedimiento de estimación de Incertidumbre con base en fuentes globales ⁵

4.4 FIGURAS IMPORTANTES DE MÉRITOS ANALÍTICOS ^{6,7,8}

Durante el proceso de validación se obtiene evidencia la cual puede ser tratada estadísticamente para arrojar resultados o figuras de mérito analítico, que permiten

concluir la funcionalidad de la técnica aplicada. A continuación se citan dichos parámetros.

4.4.1 Exactitud

Es la proximidad entre el resultado de una medición y la media de un conjunto de datos y se expresa en términos de porcentaje de error o porcentaje de recuperación. Se puede medir a partir de la comparación de los valores obtenidos por medio de las metodologías disponibles, respecto a los emitidos por la empresa proveedora de las soluciones, o por medio del porcentaje de recuperación o de error (Ecuación 1).

$$\% \text{ Recuperacion} = \frac{\text{resultado obtenido}}{\text{resultado esperado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

4.4.2 Precisión

Es la medida del grado de la repetibilidad o correlación de los resultados obtenidos mediante un método analítico. Se puede medir por el grado de reproducibilidad (precisión intermedia) o de repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Los parámetros de calidad de la precisión son: La desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

La desviación estándar, "S", expresa la desviación de los valores con respecto a al valor medio (Ecuación 2). Por otra parte, el coeficiente de variación "CV", proporciona una interpretación porcentual del grado de variabilidad de la desviación estándar (Ecuación 3).

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}{n-1} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde \bar{X} , es el valor medio obtenido de una serie de datos; X_i es el valor individual obtenido para cada una de las diferentes determinaciones y n es el número de determinaciones o repeticiones.

4.4.3 Límite de detección (LOD)

El límite de detección se define como la menor concentración de un elemento en la solución que se puede detectar con un 95% de certeza, por lo tanto, la concentración que produce una desviación igual a 3, veces la desviación estándar de un conjunto de lecturas se puede definir como el límite de detección. Históricamente se ha definido como la concentración de un analito que produce la desviación de la línea base de un registrador gráfico que es igual al doble del pico de la línea base. Este parámetro es una cifra teórica y no debería tratar de medirse rutinariamente, lo común es medir mínimo 10 veces por encima de dicho límite. También es definido como se menciona en la (Ecuación 4)

$$LOD = \frac{3 S_b}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y $m_{promedio}$ es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

4.4.4 Límite de cuantificación (LOQ)

Es la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. Se ha sugerido el valor calculado mediante la ecuación 5.

$$LOQ = \frac{10 S_b}{m_{promedio}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde S_b es la desviación estándar promedio de los interceptos de las curvas realizadas y $m_{promedio}$ es el promedio de las pendientes de las curvas de calibración realizadas.

4.4.5 Linealidad

Es el grado de proporcionalidad directa entre un par de variables de un método analítico. Generalmente se reporta como la variación de la pendiente de la línea de regresión.

Para medirse se realiza una “curva de calibración” con la cual se establece la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico, calculada por el método de ajuste mínimos cuadrados según la ecuación 6.

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 6}$$

Dónde: x , es la concentración del analito; m es la pendiente de la recta; y es la respuesta del método y b es el intercepto con el eje y . Los términos m y b , pueden ser calculados a través de las siguientes ecuaciones (Ecuaciones 7 y 8)

$$m = \frac{xy - \frac{x \cdot y}{n}}{x^2 - \frac{(x)^2}{n}} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$b = \frac{y - m \cdot x}{n} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde n es el número de soluciones patrón. Se calcula además el coeficiente de regresión (r^2) el cual refleja el grado de ajuste de los puntos a la recta, y el coeficiente de correlación o proporcionalidad (r), que demuestra la relación entre las variables.

4.4.6 Sensibilidad

Es la medida de la capacidad del instrumento para detectar pequeñas variaciones en la concentración de un analito, según la IUPAC, la sensibilidad se define como la pendiente de la curva de calibrado, a mayor pendiente mayor sensibilidad.^{6,7}

4.4.7 Repetibilidad

Resultados obtenidos bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, con los mismos equipos y con la misma muestra homogénea.⁶

4.4.8 Precisión intermedia

Resultados obtenidos dentro del laboratorio por el mismo analista, con los mismos equipos, en un intervalo largo de tiempo (días distintos) y con la misma muestra homogénea.^{6,7}

4.4.9 Incertidumbre

La palabra “incertidumbre” significa duda, y por lo tanto, en un sentido más amplio “incertidumbre de medición” significa duda en la validez del resultado de una medición. La incertidumbre es un parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores, que en forma razonable se le podría atribuir a una magnitud por medir.^{8,9}

- **Incertidumbre tipo A:** Componentes que pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados que pueden caracterizarse por desviación estándar.
- **Incertidumbre tipo B:** Pueden caracterizarse también por desviaciones estándar, pero se evalúan a partir de distribuciones de probabilidades supuestas, basadas en la experiencia o en otro tipo de información.
- **Trazabilidad:** Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón, por la cual pueda ser relacionado a referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones, teniendo todas incertidumbres determinadas.
- **Incertidumbre estándar:** Incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar.
- **Incertidumbre estándar combinada:** Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición, cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de algunas otras magnitudes, igual a la raíz cuadrada positiva de la suma términos; varianzas y covarianzas de estas otras magnitudes ponderadas.

- **Incertidumbre expandida:** Cantidad que define un intervalo alrededor de una medición del que se puede esperar que abarque una fracción grande de la distribución de valores que razonablemente pudieran ser atribuidos al mesurando.

- **Calibración:** Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones.

Pasos a seguir en el proceso de evaluación de la incertidumbre.^{9,10}

Se debe expresar matemáticamente la relación entre la magnitud Y y magnitudes de entrada X_i .

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

Ecuación

9

Determinar el valor (X_i) de cada una de las magnitudes de entrada (X_i) mencionados anteriormente.

Evaluar la incertidumbre estándar $U(X_i)$ con que fue determinado cada valor X_i e identificar fuentes de incertidumbre.

Existen dos (2) tipos de incertidumbre estándar:

- Evaluación de la incertidumbre estándar tipo A. Se denomina “incertidumbre estándar” (U_i), a la desviación estándar experimental del valor medio de una serie de mediciones $S(X_i)$.

$$U_i = \frac{S^*(X_i)}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 10

Donde n = número de mediciones efectuados.

$$U_{A(X_i)} = \frac{s^*(X_i)}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \frac{\sum_{j=1}^n \bar{X}_{ij} - X_{ij}}{\sqrt{n}}}$$

Ecuación 11

Dónde:

X_{ij} = Es el valor de la magnitud X_i en la medición j.

\bar{X}_{ij} = es el valor medio de los valores obtenidos para la magnitud X_i

j = 1 hasta n

- Evaluación de la incertidumbre tipo B. Cuando la incertidumbre no se obtiene a partir de valores obtenidos en una serie de mediciones si no de informaciones preexistentes de diversa índole, decimos entonces que se trata de una incertidumbre tipo B.

Caso 1: La incertidumbre asciende a la resolución de un instrumento de medida.

$$U_{B.RESOLUCION} = \frac{\text{Resolución}}{2 * \sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 12}$$

Caso 2: La especificación de incertidumbre de un elemento de medición se indica respecto de un nivel de confianza.

NC = m % γ_{ef} (grados de libertad) = n : k = p

$$u_B = \frac{u_E}{k} \quad \text{Factor t student.} \quad \text{Ecuación 13}$$

Caso 3: La especificación de incertidumbre no es explícita si no que se da un límite máximo para el error del instrumento (+/- a).

$$u_B = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Se debe evaluar las covarianzas asociadas a todas las magnitudes que estén correlacionadas, calcular el valor de medición “y” de la magnitud “Y”, utilizando las estimaciones X_i , determinar la incertidumbre estándar compuesta $u_{c(y)}$ a partir de las incertidumbres estándar y de las covarianzas asociadas a las magnitudes de entrada, hallar el número efectivo de grados de libertad γ_{ef} y determinar mediante la fórmula de WELCH-SATTERTH WAITE:

$$\gamma_{Ef} = \frac{u_{c(y)}^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_{i(y)}^4}{\gamma_i}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Dónde:

γ_i = Número efectivo de grados de libertad de cada contribución $u_{i(y)}$, cuyo valor se obtiene aplicando las siguientes reglas:

γ_i : n - 1 Para evaluaciones tipo A

γ_i = ∞ Cuando se apliquen distribuciones rectangulares.

γ_i = 50 si se deduce de una distribución normal.

Se debe entonces multiplicar la incertidumbre estándar compuesta $u_{c(y)}$ por el factor k de cobertura correspondiente al número efectivo de grados de libertad (γ_{ef}) y de nivel de confianza deseado.

- **Cálculo de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuentes globales de incertidumbre.**^{9,10}

Se calcula con base en los resultados de evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, de la siguiente forma:

Se debe calcular inicialmente el promedio de los resultados obtenidos tanto a concentraciones bajas de analito, como a altas concentraciones.

La ecuación a utilizar es:

$$x_{prom} = \frac{x_i}{n} \quad \text{Ecuación 16}$$

Se calcula la desviación estándar de los resultados obtenidos, así:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{prom})^2}{(n - 1)}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Posteriormente se calcula la desviación estándar relativa de cada grupo de datos:

$$RSD = \frac{s}{x_{prom}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Se calcula la Desviación Estándar Relativa del total de datos. RSDt.

$$RSDt = \frac{\sqrt{\left(\frac{s_1}{x_{p1}}\right)^2 \times n_1 + \left(\frac{s_2}{x_{p2}}\right)^2 \times n_2}}{(n-1)_1 + (n-1)_2} \quad \text{Ecuación 19}$$

Adicionalmente se calcula la recuperación de los patrones con base en la ecuación:

$$\% \text{ Recuperacion } \% R = \frac{(\text{Concentracion Obtenida Experimental})}{(\text{Concentracion Real Preparada})} \times 100 \quad \text{Ecuación 20}$$

Se calcula el promedio de los recuperados, así:

$$R_p = \frac{R_i}{n} \quad \text{Ecuación 21}$$

La desviación estándar de los recuperados SRp:

$$s_{Rp} = \sqrt{\frac{\sum (R_i - R_{prom})^2}{(n - 1)}} \quad \text{Ecuación 22}$$

También se debe calcular la incertidumbre en la recuperación promedio, mediante la siguiente ecuación:

$$u_{Rp} = \frac{s_{Rp}}{n}$$

Ecuación 23

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia (α) del 5% y un nivel de confianza del 95%, para (n-1) grados de libertad. Es decir para ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1.

Se establece la H_0 (hipótesis nula). El factor de recobro es significativamente diferente de 1.

Se calcula el t experimental t_{exp} y se compara con el t crítico t_{crit}

Si el $t_{exp} > t_{crit}$ se rechaza la H_0 .

Si el $t_{exp} < t_{crit}$ se acepta la H_0 .

La incertidumbre se calcula así:

- Incertidumbre combinada total (U_c total)

$$u_{ctotal} = \sqrt{\frac{u_{Rp}^2}{R_p} + RSDt^2}$$

Ecuación 24

Incertidumbre expandida del método (U exp mét) (\pm)

$$u_{exp \text{ mét}} = 2 \times u_{ctotal}$$

Ecuación

La incertidumbre expandida en la medición u (\pm) se expresa:

$$u = \pm [\] \times u_{exp \text{ met}}$$

Ecuación 26

4.4.10 Robustez

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc.

Frecuentemente estos estudios se realizan retrospectivamente, a partir de los resultados históricos obtenidos en diferentes condiciones.

El método debe ser “robusto” (reproducibile) frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien ya que se alteran de manera ordenada las condiciones óptimas del mismo.

En esta metodología se utilizará el diseño de Plackett y Burman, el cual permite estudiar el efecto de n variables en n+1 ensayos. En la tabla 1 se presenta el diseño experimental teórico para 7 variables en 8 ensayos.¹¹

Tabla 1. Matriz diseño experimental de Plackett y Burman para 7 variables.¹¹

Factor/Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	C	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	E	E	e	e	E	e	E
F/f	F	F	f	F	F	f	f	F
G/g	G	G	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	T	u	v	w	x	y	z

Las variables correspondientes al nivel alto (condiciones óptimas) se indican con letras mayúsculas y las correspondientes al nivel bajo de la variable en cuestión se indican con letras minúsculas (tabla 2)¹¹

Tabla 2. Variables fijas y alteradas en el ensayo de Robustez

Variable	Valor de Validación	Valor Alterado
1	A	a
2	B	b
3	C	c
4	D	d
5	E	e
6	F	f
7	G	g

Con la diferencia de medias para cada parámetro se puede decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre los resultados (tabla 3)^{11,12}.

Tabla 3. Diferencia de medias de las variables en estudio¹¹.

Parámetros	Diferencia
A-a	$V_A=1/4(s+t+u+w)-1/4(w+x+y+z)$
B-b	$V_B=1/4(s+t+w+x)-1/4(u+v+y+z)$
C-c	$V_C=1/4(s+u+w+y)-1/4(t+v+x+z)$
D-d	$V_D=1/4(s+t+y+z)-1/4(u+v+w+x)$
E-e	$V_E=1/4(s+u+x+z)-1/4(t+v+w+y)$
F-f	$V_F=1/4(s+v+w+z)-1/4(t+u+x+y)$
G-g	$V_G=1/4(s+v+x+y)-1/4(t+u+w+z)$

Si la diferencia obtenida para el cambio efectuado ($|V_B|$) es mayor, al producto de la desviación estándar del estudio de precisión * $\bar{2}$, hay diferencia significativa.

4.5 SUELOS DE CORTES DE PERFORACIÓN PETROLERA

Existen diversas fuentes de material de desecho en una operación de perforación. Dichas fuentes incluyen: lodos de perforación, cortes de perforación, desechos químicos, cementos, desechos metálicos, basura en general (combustible).

Los cortes de perforación son los pedazos más pequeños de la formación perforada por la broca y que es reintegrado a la superficie mediante el fluido. Generalmente, son pequeños y están compuestos de arcillas, esquistos, arenisca, carbonatos y haluro.

Dichos cortes son remojados en el fluido de perforación y vaciados del equipo de separación mecánico, junto con el lodo de perforación de exceso, hacia el sumidero.¹³

4.6 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's)

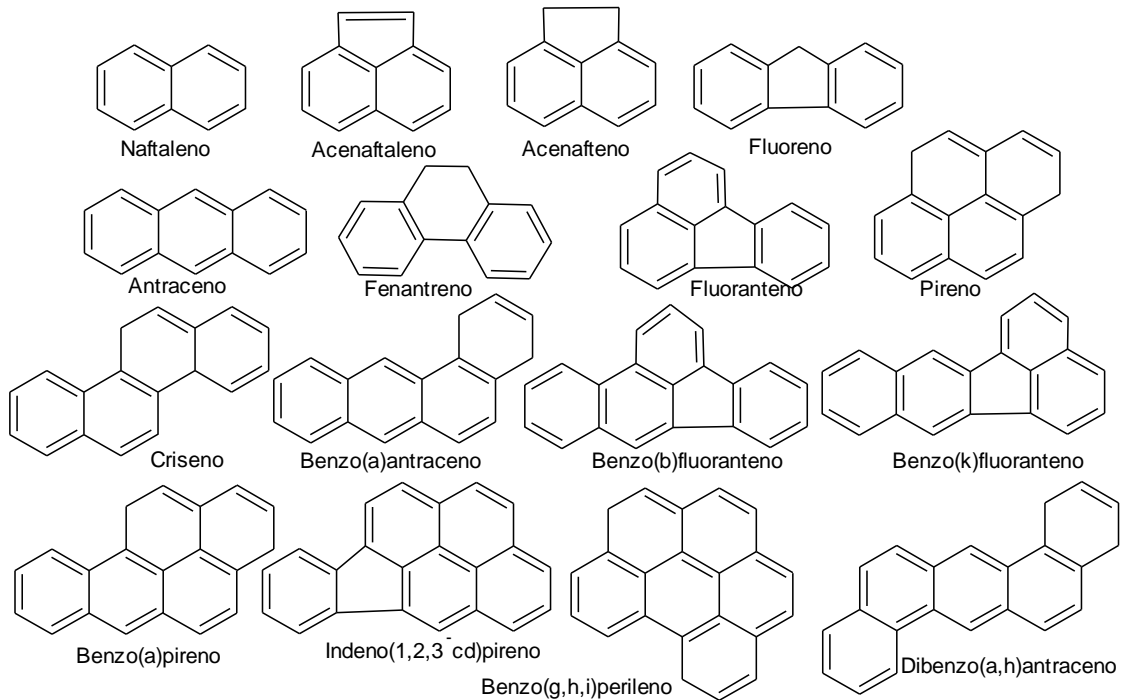
Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) se forman por pirólisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno. A elevadas temperaturas, la pirólisis de compuestos orgánicos produce fragmentos de moléculas y radicales que se combinan para dar lugar a los HAP's. La composición de los productos de la piro síntesis depende del combustible, la temperatura y el tiempo de permanencia a altas temperaturas. Los combustibles que forman HAP's son metano, otros hidrocarburos, hidratos de carbono, ligninas, péptidos, etc. Sin embargo, los compuestos insaturados y las estructuras cíclicas suelen favorecer la formación de los HAP's¹⁴. Evidentemente, los HAP's se liberan de la zona de combustión en forma de vapores.

Debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría de los HAP's se condensan en el acto sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas. Los HAP's liberados a la atmósfera en forma de vapor son adsorbidos por las partículas presentes en ella. Por ello, se producirá una diseminación de aerosoles que contiene HAP's, que pueden ser transportados a grandes distancias por los vientos¹⁵

Los HAP's pueden incorporarse al organismo por ingestión, inhalación o absorción dérmica. Como consecuencia de su baja solubilidad en agua y elevada en sustancias de naturaleza lipídica, se acumulan en los organismos, en la materia orgánica y sedimentos, pudiendo permanecer así largos periodos de tiempo garantizando su biodisponibilidad. La lentitud con que son degradados estos compuestos, provoca su acumulación en plantas, peces e invertebrados acuáticos y terrestres, incorporándose a la cadena trófica¹⁵.

En la figura 1 se muestran las estructuras moleculares de los 16 principales Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's).

Figura 1. Estructura molecular de los Hidrocarburos aromáticos policíclicos



4.6.1 Propiedades físicas y químicas de los HAP's

A temperatura ambiente, son sólidos, de baja volatilidad, con altos puntos de fusión, muy poco solubles en agua debido a su baja polaridad (entre más anillos posea la estructura menos soluble es en el agua). Las reacciones que pueden sufrir en un muestreo atmosférico e inducir así a pérdidas de HAP's son la foto descomposición y las reacciones con óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ozono y radicales hidroxilo¹⁴. Los sistemas conjugados de enlaces π de los HAP's son los responsables de su estabilidad química. La principal vía de degradación de estos compuestos incluye procesos químicos, fotolíticos o metabólicos asociados a microorganismos. En algunos casos se dan conjuntamente más de una, dependiendo de condicionantes como la temperatura, el oxígeno y microorganismos disponibles. Entre los procesos químicos, se incluyen los tratamientos de cloración y ozonización del agua, entre los fotolíticos la acción conjunta de oxígeno y luz solar¹⁶.

4.6.2 Toxicidad de los HAP's

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on cancer, IARC) afirma que, existen suficientes evidencias, que varios Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) son carcinógenos, así como que, algunos compuestos de esta familia aumentan el efecto carcinogénico de otros HAP's, como por ejemplo el pireno, que potencia el efecto del benzo(a)pireno.

Los HAP's se encuentran en la lista de contaminantes prioritarios debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas en general, aunque su propiedad carcinogénica varía de un compuesto a otro. Por ejemplo, el benzo(a)pireno se considera un potente carcinógeno, y el naftaleno es no carcinógeno.¹⁷

Se consideran carcinógenos: benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno y el indenopireno.

Se consideran no carcinógenos: Acenafteno, Antraceno, Fluoranteno, Fluoreno, Naftaleno y Pireno.

Estos compuestos se absorben por las vías respiratorias, el aparato digestivo y la piel en donde la tasa de absorción por los pulmones depende del tipo de HAP's, el tamaño de las partículas sobre las que están absorbidos y la composición del adsorbente. Los HAP's adsorbidos sobre partículas se eliminan de los pulmones con mayor lentitud que los hidrocarburos libres. En el aparato digestivo se produce una absorción rápida en los roedores, pero los metabolitos vuelven al intestino mediante la excreción biliar.

4.6.3 Fuentes generadoras de HAP's

Los procesos como erupciones volcánicas y fuegos forestales proveen una fuente de HAP's. Las fuentes no antropogénicas consumen más energía y la concentración de HAP's es mayor en los suelos y sedimentos. Mediante estos episodios, los HAP's son transportados por el aire cruzando grandes áreas geográficas atrapados dentro de partículas de polvo. También pueden ser generados químicamente por pirólisis. Las fuentes antropogénicas son la principal causa de contaminación ambiental y es el foco primordial de muchos programas de remediación. Los HAP's se pueden encontrar en la combustión incompleta de materiales combustibles orgánicos como el diesel, gasolina, madera y vegetación. Fuentes claves de HAP's pueden originarse por derrames de petróleo y diesel, y de procesos industriales como es la licuación y gasificación durante la producción de carbón.¹⁸

4.7 METODOS DE EXTRACCIÓN

4.7.1 Soxhlet

Un diagrama visual de un aparato típico soxhlet se muestra en la figura 2. Consta de tres componentes: la parte superior es un condensador de reflujo de vapor, en la mitad hay una cámara con un dispositivo de sifón. La cámara caliente conecta a un balón fondo plano. La muestra es localizada en un dedal de celulosa dentro de la cámara caliente. Generalmente, 300 mL de solvente (para 10g de muestra) es adicionado al balón. Perlas de ebullición también suelen ser adicionadas y el balón es calentado sobre una manta de calentamiento. El vapor del solvente pasa a través del tubo lateral y va hacia el condensador de reflujo y allí es condensado en pequeñas gotas que caen al dedal contenido en la cámara. Cuando el solvente cubre el tope de

la cámara, éste regresa al balón a través del sifón de la cámara; este ciclo se repite varias veces por un tiempo determinado. Ya que el analito extarído tiene puntos de ebullición más altos que el solvente de extracción, son acumulados en el balón donde el solvente re circula. La muestra siempre es extraída con solvente limpio en cada ciclo. La extracción soxhlet es lenta debido a que tarda de 6 a 48 horas. El volumen de solvente es largo y procesos de concentración se deben utilizar¹⁹

Figura 2. Equipo Soxhlet



4.7.2 Ultrasonido

La primera aparición del ultrasonido se dio en 1971 y desde entonces se ha desarrollado y se utiliza en un sin número de aplicaciones. El principio consiste en hacer vibrar las partículas sólidas, las cuales se aceleran ante la acción ultrasónica, logrando así la extracción del soluto de la parte sólida a la fase orgánica del solvente^{19,20}.

Figura 3. Equipo de extracción ultrasónica



4.7.3 Extracción en fase sólida (SPE)

Es una de varias técnicas disponibles para un analista en la cual se genera una unión entre la recolección de las muestras y su correspondiente análisis. El uso de la extracción en fase sólida data de la época de mediados de los años 70s cuando las columnas de relleno con partículas de resinas eran utilizadas para concentrar contaminantes orgánicos de muestras acuosas, solo hasta finales de los años ochenta y principios de los 90s se comienza un desarrollo en la técnica de extracción en fase sólida y en su uso analítico dando a conocer la gran expansión de esta hasta ahora conocida²⁰.

La SPE consta de 4 componentes, un reservorio, dos discos, filtros y una cama adsorbente.

Entre los adsorbentes encontramos la sílica, la cual es un polímero inorgánico de fórmula molecular $(\text{SiO}_2)_x$ es uno de los más usado en la SPE debido a su precio y su alta disponibilidad. Al final de las cadenas polimérica se posicionan grupos hidroxilos los cuales son los encargados de darle el carácter típico a las sílica. Se realizan modificaciones con otros compuestos para mejorar su polaridad ya sea aumentando o disminuyéndola, produciendo una ostensible mejora al interactuar con los compuestos de interés.

Existen otros tipos de adsorbentes como los óxidos de aluminio, magnesio, titanio que cumplen una función muy similar a la de los grupos hidroxilos de la sílica. Por último se tienen los adsorbentes basados en polímeros, los cuales ayudan en ocasiones con los problemas que tienen los óxidos y la sílica siendo este el de su alta actividad a la hora de interactuar con los componentes²⁰.

4.8 METODO DE CUANTIFICACIÓN

4.8.1 Cromatografía de gases (CG)

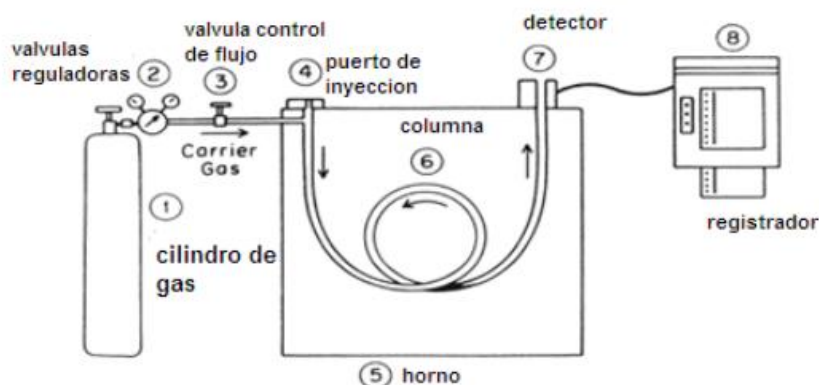
La definición oficial de la International Unión of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) dice: la cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes serán separados y distribuidos entre dos fase una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (la fase móvil) moviéndose en una dirección definida.

La cromatografía de gases se ha convertido en la técnica analítica más usada en el mundo para la separación y análisis compuestos volátiles. Esta técnica tiene la capacidad de cualificar (determinar la estructura química) y cuantificar (cantidad del compuesto presente) los componentes de una o varias muestras, determinan la cinética y mecanismo de reacción, a su vez permite la solución de problemas en otros campos como en la farmacéutica para el control de calidad de nuevos productos y el monitoreo de metabolitos en sistemas biológicos, la petroquímica para determinar los componentes en los productos del petróleo, en la industria alimenticia para la determinación de antioxidantes y preservantes en alimentos; además es

ampliamente usada para la detección de pesticidas y sus residuos en diversas matrices²⁰.

En la cromatografía gaseosa la fase móvil es un gas que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Esta fase fija puede ser un sólido poroso (cromatografía gas-sólido o CGS), o bien una película líquida delgada que recubre un sólido particulado o las paredes de la columna (cromatografía gas-líquido o CGL). El cilindro de gas contiene un gas transportador como hidrógeno, helio o nitrógeno, que es continuamente arrastrado a través de la columna cromatográfica a una temperatura y flujo determinados. Se inyecta una pequeña muestra para análisis, usualmente con una micro jeringa, por el puerto de la muestra donde es evaporada instantáneamente para pasar sus componentes al estado gaseoso. La corriente del gas transportador que fluye constantemente transporta los constituyentes gaseosos a través de la columna cromatográfica. Los gases viajan a diferentes velocidades, de modo que emergen de la columna a diferentes momentos. Su presencia en el gas transportador que sale es detectada por medios físicos o químicos, y la respuesta del detector pasa al dispositivo de registro, quizá después de una integración electrónica (Figura 4)

Figura 4. Sistema cromatógrafo de gases²⁰



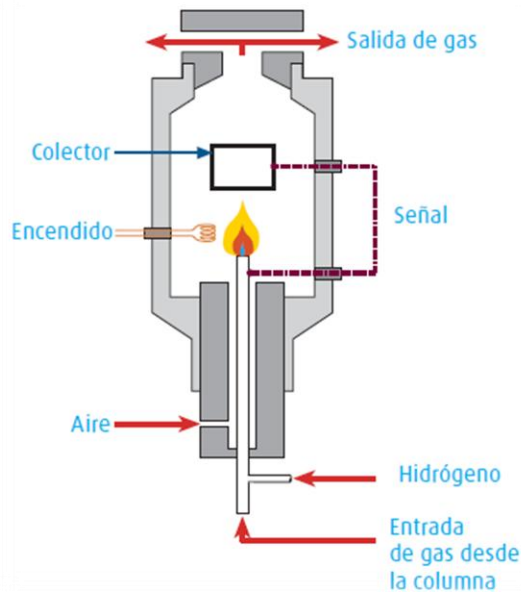
4.9 SISTEMA DE DETECCIÓN

4.9.1 Detector de ionización por llama FID

Es el detector no selectivo más usado (figura 5) el cual durante la quema de un compuesto orgánico, forma varios iones y como consecuencia, la flama resultante se hace conductora de electricidad. En el funcionamiento del FID el gas de arrastre proveniente de la columna cromatográfica es mezclado con H_2 y quemado con aire u O_2 . La flama resultante se queda contenida entre dos electrodos, polarizados por un voltaje constante, Como la flama de H_2 forma pocos iones, este es un pésimo conductor eléctrico y casi ninguna corriente pasa entre los electrodos. Al eluir un compuesto orgánico, este es quemado y son formados iones en la flama, que pasa a

conducir corriente eléctrica. La corriente eléctrica resultante, del orden de pA, es amplificada y constituye la señal cromatográfica²¹.

Figura 5.Diagrama detector de ionización por llama FID²⁰.



4.10 EFICIENCIA CROMATOGRÁFICA

La eficiencia cromatográfica consiste en un conjunto de ensayos los cuales comprueban que el sistema (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método.

- **Factor de capacidad (k')**

También definido como relación de distribución de masa (D) se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en una columna (t_0). Este factor determina la retención de un soluto y puede ser calculado como se expresa en la ecuación 27:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Ecuación 27

Dónde:

t_0 = tiempo en el que un compuesto no retenido pasa por la columna

t_R = tiempo que gasta el compuesto de interés en pasar por el sistema

Valores bajos de k' indican que el pico eluye muy próximo al frente de solvente y se puede comprometer la selectividad. Son recomendables valores de k' superiores a 1, consiguiéndose una óptima resolución con valores mayores de 2.

- **Coeficiente de reparto (K)**

Propiedad termodinámica del sistema soluto-fase estacionaria-fase móvil independiente del proceso cromatográfico. Concentración de soluto en la fase estacionaria frente a la concentración de soluto en fase móvil a temperatura constante.

- **Tiempo muerto (t_m)**

Es el tiempo de retención de una sustancia insoluble en la fase estacionaria ($K=0$).

- **Resolución**

Cada sustancia se desplaza a una velocidad característica dada por el valor de su relación frontal en dichas condiciones. Altura equivalente a una placa teórica. Por tratarse de un método donde se separa por elución es mejor referirse a tiempo de elución más que a distancias recorridas.

- **Eficacia**

Una columna será más eficaz mientras mayor sea el número de placas teóricas que tenga. Para poder hacer comparaciones entre columnas es necesario establecer condiciones similares de trabajo.

5. METODOLOGÍA

5.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

- ✓ **Equipos:** se utilizó un evaporador rotatorio IKA RV-10 Digital (figura 8), balanza analítica OHAUS, Ultrasonido ELMA de 300 Watts (figura 9), equipo de extracción en fase sólida MANIFOLD Agilent Technologies (figura 10), Bomba de vacío IKA, cromatógrafo de gases 7820A Agilent Technologies.
- ✓ **Cromatógrafo de gases 7820A:** Consta de un inyector automático con tipo de inyección Split/Splitless, horno de calentamiento, detector de ionización por llama (FID) (figura 6), columna DB-5,625 , 30m, 0.250mm, 0.25 μ m. Todo lo anterior marca Agilent Technologies (figura 7).
- ✓ **Materiales:** Transferpipeta digital de 10-100 μ L, transferpipeta digital 100-1000 μ L, balones aforados clase A de 1 y 2 mL, frascos Schott tapa azul de 50 mL, embudos de filtración al vacío, balones fondo plano de 250 mL, balones pera de 125 mL, pipetas pasteur y vasos de precipitado.
- ✓ **Reactivos:** Todos los solventes utilizados fueron grado SUPRASOLV o grado pesticida (Diclorometano y acetona), sulfato de sodio anhidro grado reactivo, Stock de una mezcla de 16 HAP's, concentración de 2000 mg.L⁻¹ marca RESTEK (SV

Calibration MIX #5, ampolla de 1mL), cartuchos Florisil (1g, 20mL) Agilent Technologies y agua desionizada libre de orgánicos.

- ✓ **Software:** Se utilizó la ChemStation OpenLab C.01.05 para el análisis cromatográfico y el SPSS versión 22 para el análisis estadístico.

Figura 6. Detector de ionización por llama FID



Figura 7. Cromatógrafo de gases



Figura 8. Evaporador rotatorio

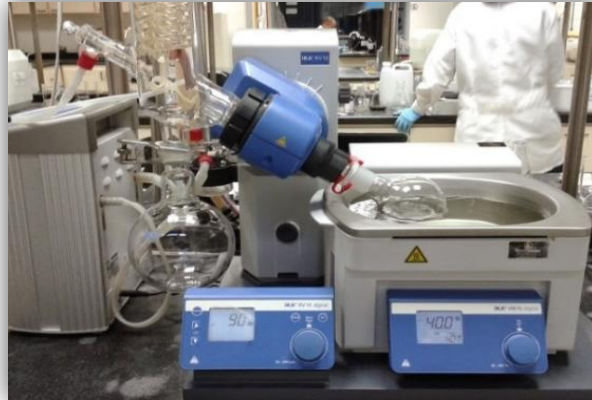


Figura 9. Ultrasonido



Figura 10. Extracción en fase sólida (SPE)



5.2 CONSIDERACIONES PRINCIPALES

El proceso de validación y verificación de un método de análisis consiste en demostrar experimentalmente la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas, como también en obtener la evidencia documentada del procedimiento seguido, lo cual debe corresponder a un diseño experimental, un tratamiento estadístico apropiado y unos criterios de aceptación²², de acuerdo con los atributos que describen cada técnica analítica, para lo cual se establecen las variables químicas e instrumentales que permitan conseguir las mejores condiciones de selectividad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad basándose en los PGC de validación desarrollados sobre cromatografía en el laboratorio, además de la bibliografía referenciada en las metodologías EPA 8100²³ y EPA 8000²⁴.

5.2.1 Lavado de material

El material se lavó constantemente con el solvente utilizado, para eliminar residuos. Los materiales de vidrio (vasos de precipitados, pipetas, frascos o botellas) se lavaron con etanol. El material no volumétrico se puso en un baño con jabón neutro libre de fosfatos a una temperatura de 50°C; luego, se enjuagó con agua caliente para la expulsión de partículas flotantes. El material volumétrico se lavó con jabón y posteriormente con NaOH 0.1N. Finalmente se lavó con abundante agua de grifo, agua destilada y alcohol.

El secado y el almacenamiento del material de vidrio limpio es de gran importancia, por ésta razón la cristalería de laboratorio no volumétrica se dejó secar a 100°C en el horno y bajo ninguna circunstancia estos artículos pequeños se dejaron a la intemperie sin cubierta protectora. La nube de polvo levantada por el barrido diario del piso del laboratorio podía volver a contaminar más eficazmente el material de vidrio limpio. El material reposó boca abajo y antes de ser utilizado era purgado con el solvente en el cual se iba a utilizar en el análisis^{22,25}.

5.2.2 Metodología de calibración del material usado en la validación

Se calibró el material de vidrio volumétrico clase A de acuerdo al documento interno de calibración y verificación de material de vidrio existente en ChemiLab S.A.S. y se revisaron sus respectivos certificados de calidad suministrados por el proveedor. Se verificó la calibración de dos transferpipetas (una de 10–100µL y otra de 100–1000µL) y una balanza analítica con una precisión de 0,0001g.

5.2.3 Preservación y estabilidad de la muestra

La muestra de suelo se colectó en un recipiente ámbar de vidrio de boca ancha previamente lavado y seco, la tapa se cubrió con papel aluminio para evitar el contacto con el material de plástico de la tapa y se almacenó a 6°C, para su transporte al laboratorio.

La extracción de la muestra de suelo se hizo de forma inmediata y el extracto orgánico se almacenó en viales ámbar con tapón en PTFE y a la temperatura inferior a 4°C, para su posterior análisis

5.3 ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

5.3.1 Perfil cromatográfico

De acuerdo a la revisión bibliográfica de metodologías aplicadas a la cuantificación de HAP's por CG/FID y certificado de análisis aportado por RESTEK se crearon diferentes métodos en el Software OpenLab.

Se preparó una solución de trabajo de 50 mg/L en diclorometano a partir del stock de 2000 mg.L⁻¹ y se inyectó al cromatógrafo de gases. Se ensayaron diferentes condiciones de trabajo, en el inyector, horno y detector, hasta encontrar el mejor perfil de los 16 HAP's.

5.3.2 Curvas de Van Deemter

En una cromatografía de columna, la fase móvil arrastra las moléculas del soluto a lo largo de la columna, por tanto, el flujo de fase móvil influye en el proceso de separación. Si el flujo es demasiado alto las moléculas del soluto no tendrán suficiente tiempo para interactuar debidamente con los puntos activos de la fase estacionaria, teniendo como resultado una mala separación, mala eficiencia. Por lo contrario, si se emplea un flujo demasiado bajo, las moléculas del soluto permanecerán demasiado tiempo en la fase móvil donde el fenómeno de difusión longitudinal provocará el ensanchamiento de las bandas, lo que acarreará una pérdida de sensibilidad en el método y un aumento considerable en el tiempo de análisis. Por la anterior razón el flujo de fase móvil afecta la eficiencia de la columna. Este flujo óptimo puede ser observado y determinado claramente en las gráficas de Van Deemter (figura 11), mediante la ecuación 28, en las cuales se grafica la velocidad lineal (μ) contra la altura de plato teórico (H). La determinación de la velocidad lineal óptima (flujo de fase móvil óptimo) es un parámetro que se emplea normalmente en la cromatografía de gases para mejorar, en muchos casos, su eficiencia. Sin embargo rara vez se emplea en cromatografía líquida ya que en esta las velocidades son muy pequeñas (≤ 0.5 mm.s⁻¹), por lo que no resulta práctica su determinación.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Ecuación 28

Donde:

H= altura equivalente a un plato teórico, milímetros.

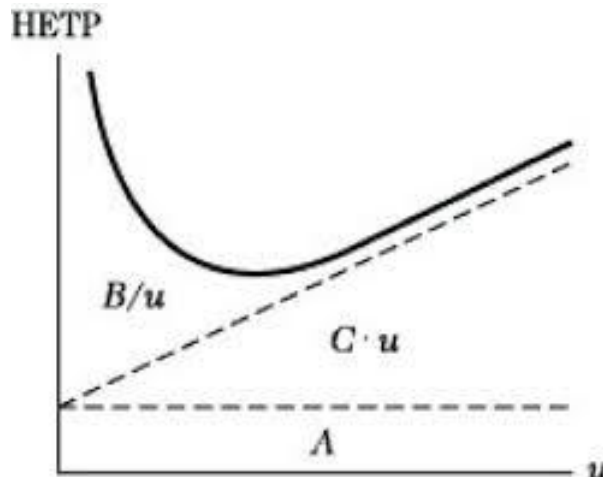
u= L/ tr aire promedio de la velocidad lineal, cm.s⁻¹

A= $2\lambda dp$ difusión aparente

B= $2\gamma D_m$ coeficiente del término debido a la difusión molecular

$C = (8/\pi)(k'/[1 + k']^2)(df/D_s)$ coeficiente del término debido a la resistencia de transferencia de masas

Figura 11. Gráfica de Van Deemter



En la teoría para las columnas capilares, se considera que la difusión aparente no contribuye de manera apreciable al ensanchamiento de los picos en este tipo de columnas. El coeficiente relacionado con la difusión molecular tiene un valor de uno debido a que la distancia que recorre la partícula es igual a la longitud de la columna. El término relacionado con la transferencia de masas viene dado en función del diámetro de la columna, pues en este tipo de columna es más importante que el tamaño de partícula de relleno.

La ecuación de esta teoría es un caso particular de la ecuación de la teoría cinética, en este caso se omite el término A pues su valor es despreciable; se relacionan las magnitudes que caracterizan la geometría del soporte y el término C se presenta de manera distinta pues en este tipo de columna es más importante la fase móvil que el tamaño de partícula.

Para la determinación de la velocidad lineal adecuada en la metodología, se preparó una solución de trabajo de 50 mg.L^{-1} , donde fue inyectada al cromatógrafo de gases a diferentes velocidades lineales, desde 15 cm.s^{-1} hasta 58 cm.s^{-1} .

5.3.3 Idoneidad del sistema cromatográfico

El test de idoneidad del sistema consistió en un conjunto de ensayos que permitieron comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumental) fue adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se había establecido y validado dicho método²⁶.

Se evaluaron los parámetros de la columna cromatográfica tales como: tiempo de retención (t_r), resolución (R_s), factor de selectividad (α), factor de capacidad (k') y

número de platos teóricos (N), realizando 5 inyecciones de la solución de HAP's a una concentración de 20 mg.L⁻¹.

5.4 VALIDACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

5.4.1 Parámetros Analíticos

- **Preparación de la curva de calibración:** Inicialmente a partir de la solución stock marca RESTEK de 2000 mg.L⁻¹ (Mezcla de 16 HAP's) se prepararon soluciones de trabajo de 100 mg.L⁻¹ con el propósito de obtener curvas de calibración en un rango lineal para cada detector, graficando el área de cada pico en función de la concentración y determinando el respectivo coeficiente de correlación para cada HAP's. Se utilizaron 5 niveles de calibración con concentraciones de 2, 5, 10, 20 y 70 mg.L⁻¹ de HAP's.
- **Validación del sistema Instrumental:** La validación del sistema instrumental se llevó a cabo con curvas de calibración de cada HAP's en diclorometano, las cuales fueron inyectadas directamente al cromatógrafo de gases (CG/FID). Se evaluó la linealidad, precisión en términos de precisión intermedia y límites críticos. Para la confiabilidad de los resultados se aplicó un tratamiento estadístico mediante el software estadístico SPSS (Versión 22).
- **Linealidad instrumental:** Se evaluaron 5 niveles de concentración durante 7 días diferentes. Se preparó una curva de calibración por día. Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permitieron concluir la linealidad instrumental en el rango utilizado, aplicable al rango lineal del detector.
- **Precisión instrumental:** Se evaluó bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día) y precisión intermedia (días diferentes). En condiciones de repetibilidad se prepararon 3 curvas de calibración con 5 niveles de concentración, las cuales se analizarán el mismo día bajo las mismas condiciones. Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon 7 curvas de calibración durante 7 días diferentes, una curva de calibración por día, para cada HAP's. Se calculó el porcentaje del coeficiente de variación (%C.V) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.
- **Límites críticos:** Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones. Seguidamente, se calculó mediante el método de mínimos cuadrados las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una de las tres curvas de calibración, con estos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos ($S_{\text{interceptos}}$) y el promedio de las pendientes (m_{prom}). Finalmente se aplicó la ecuación 5 para establecer teóricamente el valor para el límite de cuantificación (LOQ).

5.5 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HAP's

5.5.1 Procedimiento de extracción

Para garantizar la eliminación de interferencias, se utilizó como blanco de proceso, arena pre-lavada, la cual fue tratada con abundante agua desionizada y se trató con peróxido de hidrógeno. Finalmente se enjuagó con abundante agua y se secó al horno a una temperatura de 150°C.

Se prepararon 20 réplicas de muestras de suelo dopadas con una solución de 11mg/L de HAP's, en relación 5:1, obteniendo una concentración de 1.1 mgHAP's.kg⁻¹ de suelo.

Para la extracción en los dos sistemas (soxhlet y ultrasonido) se utilizó una mezcla de acetona/diclorometano en relación 1:1. De las 20 réplicas, 10 ensayos fueron utilizados en la extracción soxhlet y 10 ensayos utilizados en la extracción ultrasónica.

- **Extracción soxhlet**

La muestra de arena dopada, fue sometida a extracción en la cámara soxhlet previa adición de 10 g de sulfato de sodio anhidro, con 300 mL de solvente, durante 4 horas con 6 ciclos por hora. Finalmente el extracto se concentró en rotaevaporador hasta un volumen de 2 mL (EPA 3540C)

- **Extracción ultrasónica**

La muestra de 10 g de arena dopada, fue llevada al sistema de ultrasonido durante 3 minutos, previa adición de 10 g de sulfato de sodio anhidro, y 33 mL del solvente. Finalizado el tiempo de extracción el extracto fue filtrado a través de papel filtro Whatman # 41 Se realizaron secuencialmente dos extracciones más. Finalmente el extracto fue concentrado en rotaevaporador hasta un volumen de 2mL (EPA 3550C)²⁷.

5.5.2 Solvente de extracción

Se ensayaron dos solventes para la extracción de las muestras dopadas: una mezcla de acetona/diclorometano en relación 1:1 y tetracloroetileno, utilizando 10 réplicas de muestras dopadas para cada solvente. Las 20 réplicas de muestras de suelo fueron dopadas con una solución de 13,3 mg.L⁻¹ de HAP's, en relación 5:1, obteniendo una concentración de 2,67 mgHAP's.kg⁻¹ de suelo.

Los 20 ensayos fueron extraídos en el ultrasonido como se especifica en el inciso 5.5.1 (extracción ultrasónica)

El extracto orgánico obtenido fue concentrado en el rotaevaporador.

5.5.3 Limpieza

Se utilizó la extracción en fase sólida con cartuchos de florisil como procedimiento de limpieza de acuerdo las metodologías 8100 y 3600 de la EPA.^{23,28}, utilizando 10 réplicas de arena dopada con HAP's y se sometieron posteriormente a proceso de extracción ultrasónica (enciso 5.5.1).

Con el objeto de verificar la utilidad del sistema de limpieza, 10 réplicas de arena dopada con HAP's fueron sometidas al mismo procedimiento de extracción sin previa limpieza

Se prepararon 20 réplicas de muestras de suelo dopadas con una solución de 13,3 mg.L⁻¹ de HAP's, en relación 5:1, obteniendo una concentración de 2,67 mg de HAP's.kg⁻¹ de suelo. El extracto orgánico final fue concentrado en el rotaevaporador.

5.5.4 Efecto matriz

Se determinó realizando una curva de calibración de los HAP's en solvente (diclorometano) y otra curva de calibración con el extracto del suelo en cinco niveles de concentración: 2, 5, 10, 20 y 70 mg.L⁻¹ de HAP's

5.5.5 Muestras de validación en la metodología de HAP's en suelos de cortes de perforación (Ultrasonido, CG/FID)

De acuerdo con el método 8100, 8000 de la EPA y el PGC de validación desarrollado en ChemiLab S.A.S. se utilizaron tres muestras de suelo de cortes de perforación (concentración baja, media y alta) de textura franca arcillosa y arenosa suministrados por una empresa petrolera, dichas muestras fueron ingresadas al laboratorio de acuerdo al IT de ingreso de muestras y de codificación existente en ChemiLab S.A.S.

El análisis de las muestras de residuos se realizó durante siete días diferentes, una curva de calibración por día y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente. Se determinó la precisión en términos del % C.V para las muestras.

5.5.5.1 Preparación de las muestras sólidas

Las muestras de suelos se secaron a temperatura ambiente, se trituraron y se pasaron por un tamiz de malla 18 con apertura de 1mm, y se almacenaron en bolsas herméticas, cubiertas para evitar el paso de la luz

5.5.5.2 Extracción ultrasónica de las muestras de suelo

Se utilizó el procedimiento de baja concentración (metodología 3550C de la EPA), aplicable para suelos con contenidos menores o iguales a 20 mg.kg⁻¹ de HAP's (EPA 3550C), el nivel superior de la curva de calibración fue de 70 mg.L⁻¹ de HAP's, correspondiente a 14 mg.kg⁻¹ de HAP's en suelo seco.

La muestra de 10 g de arena dopada, fue llevada al sistema de ultrasonido durante 3 minutos a una potencia de 300 watts, previa adición de 10g de sulfato de sodio anhidro, y 33 mL de la mezcla del solvente acetona/diclorometano 1:1. Finalizado el tiempo de extracción el extracto fue filtrado a través de papel filtro Whatman # 41. Se realizaron secuencialmente dos extracciones mas, donde la tercera extracción se realizó con 34 mL de la mezcla del solvente. Los extractos orgánicos se reunieron.

5.5.5.3 Limpieza del extracto orgánico

La limpieza de los extractos se realizó mediante el procedimiento de extracción en fase sólida, con cartuchos de florisil de 1g, 20 mL.

- Acondicionamiento: Los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de la mezcla de solvente Acetona/Diclorometano 1:1
- Limpieza selectiva: inmediatamente después del acondicionamiento sin dejar secar el cartucho, se dispone el extracto orgánico al cartucho.

5.5.5.4 Concentración del extracto orgánico

El extracto orgánico limpio proveniente del cartucho, fue concentrado en el evaporador rotatorio a una temperatura de 60°C, 100 rpm, sin vacío, hasta un volumen aproximado de 1mL y finalmente se diluye hasta 2mL, se almacena en un vial de vidrio ámbar con tapa y septa en PTFE.

5.5.5.5 Cuantificación por CG/FID

Los extractos de las muestras fueron inyectadas en el CG/FID para su respectiva cuantificación de acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas en la estandarización instrumental y con la cual se validó el sistema.

5.5.5.6 Condiciones del cromatógrafo de gases

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- **AUTOMUESTREADOR (ALS)**

Volumen de inyección: 1µL

Velocidad del émbolo: Rápida

Lavados y Bombeos: Para garantizar la eliminación de Carry Over (tabla 4)

Tabla 4. Condiciones del automuestreador (ALS)

Condición	Pre-inyección	Post-inyección	Volumen (µL)
Solvente de lavado A	2	2	3
Solvente de lavado B	3	2	4
Lavados de muestra	2	N.A	2
Purga de Muestra	4	N.A	N.A

- **INYECTOR**

Temperatura del puerto de inyección: 250°C
 Presión: 9,3844 psi
 Modo: Split
 Relación Split: 20:1
 Flujo del Split: 25,221 mL.min⁻¹
 Gas Saber: ON, 20 mL.min⁻¹ después de 2min.

- **COLUMNA**

Columna Capilar: DB-5,625 , 30m, 0.250mm, 0.25µm Durabond
 Flujo: 1,261 mL.min⁻¹
 Presión: 9,3844 psi
 Velocidad Lineal: 40 cm.s⁻¹
 Tiempo de inmovilización: 1,25 min
 Flujo Constante
 Post Run: 0 mL.min⁻¹

- **HORNO**

Las rampas de temperatura se muestran en la tabla 5

Tabla 5. Rampa de Temperaturas del horno del cromatógrafo de gases

	Velocidad °C.min ⁻¹	Valor °C	Calentamiento (min)	Tiempo final (min)
Inicial	N.A	100	0	0
Rampa 1	6	285	0	30,833
Rampa 2	3	300	0	35,833
Rampa 3	75	325	1	37,167

- **DETECTOR**

El cromatógrafo de gases cuenta con un Detector de Ionización por llama FID.
 Temperatura: 300°C
 Flujo de Aire: 400 mL.min⁻¹
 Flujo gas de combustión H₂ (Carrier): 30 mL.min⁻¹
 Flujo Make up (N₂): 25 mL.min⁻¹

5.5.5.7 Repetibilidad y Reproducibilidad

El lote de muestras utilizado para la validación de la metodología 3550C y 8100 de la EPA, fueron las siguientes:

- ✓ **Blanco de curva (BK):** Solvente en el cual se preparó la curva de calibración
- ✓ **Curva de calibración (N_x):** con 5 niveles (2, 5, 10, 20 y 70 mg.L⁻¹ de HAP's)
- ✓ **Blanco proceso (BK_Proceso):** Se utilizó arena pre lavada sometida a todo el procedimiento de extracción y cuantificación

✓ **Muestra real rango bajo (MRB):** Suelo de corte de perforación petrolera con una concentración baja de HAP's.

✓ **Muestra real rango medio (MRM):** Suelo de corte de perforación petrolera con una concentración media de HAP's.

✓ **Muestra real rango alto (MRA):** Suelo de corte de perforación petrolera con una concentración alta de HAP's

Repetibilidad: Se preparó el lote de validación 5 veces el mismo día y se leyeron en el CG/FID

Reproducibilidad: Se preparó el lote de validación durante 7 días y se leyeron en el CG/FID

5.5.6 Robustez

Se estudiaron 7 variables en 8 ensayos experimentales, detallados en la tabla 6.

Tabla 6. Variables utilizadas en el ensayo de Robustez

Variable	Valor de la Validación	Valor alterado
Peso de Suelo Seco	A = 10g Suelo	a = 5g Suelo
Extracciones sucesivas	B = 3 extracciones	b = 2 extracciones
Peso de Na₂SO₄	C = 10g Na ₂ SO ₄	c = 5g Na ₂ SO ₄
Volumen final de concentración	D = 2mL concentrado	d = 1mL concentrado
Tiempo extracción ultrasónica	E = 3 min	e = 2 min
Filtrado	F = Filtrado a Gravedad	f = Filtrado al Vacío
Vacío Rotaevaporador	G = sin vacío Rotaevaporador (RE)	g = Con vacío Rotaevaporador (RE)

Letras mayúsculas corresponden al nivel alto y letras minúsculas al nivel bajo de la variable

En la tabla 7 se presenta la matriz del diseño experimental utilizada en la prueba de robustez

Tabla 7. Matriz del diseño experimental utilizado en el ensayo de Robustez

EXPERIMENTOS							
1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	A	A	a	a	a	a
10gSuelo	10gSuelo	10g Suelo	10g Suelo	5g Suelo	5g Suelo	5gSuelo	5g Suelo
B	B	b	b	B	B	b	b
3 Ext	3 Ext	2 Ext	2 Ext	3 Ext	3 Ext	2 Ext	2 Ext
C	c	C	c	C	c	C	c
10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄
D	D	d	d	d	d	D	D
2mLconc	2mLconc	1mLconc	1mLconc	1mLconc	1mLconc	2mLconc	2mLconc
E	e	E	e	e	E	e	E
3 min	2 min	3 min	2 min	2 min	3 min	2 min	3 min

Tabla 7. (Continuación)

EXPERIMENTOS							
1	2	3	4	5	6	7	8
F	f	f	F	F	f	f	F
Filtrado a Gravedad	Filtrado al Vacío	Filtrado al Vacío	Filtrado a Gravedad	Filtrado a Gravedad	Filtrado al Vacío	Filtrado al Vacío	Filtrado a Gravedad
G	g	g	G	g	G	G	g
sin vacío	Con vacío	Con vacío	sin vacío	Con vacío	sin vacío	sin vacío	Con vacío
RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE
s	t	u	v	w	x	y	z

5.5.7 Análisis estadístico de los resultados

Con el objetivo de validar las metodologías utilizadas, se aplicó un tratamiento estadístico a todos los resultados obtenidos, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 22, aplicando pruebas de normalidad para determinar si los resultados vienen de una población normal y aplicar pruebas paramétricas como ANOVA o no paramétricas, según corresponda y así evaluar si los resultados se encuentran en un 95% de confianza para los n datos experimentales obtenidos.

6. RESULTADO Y ANÁLISIS

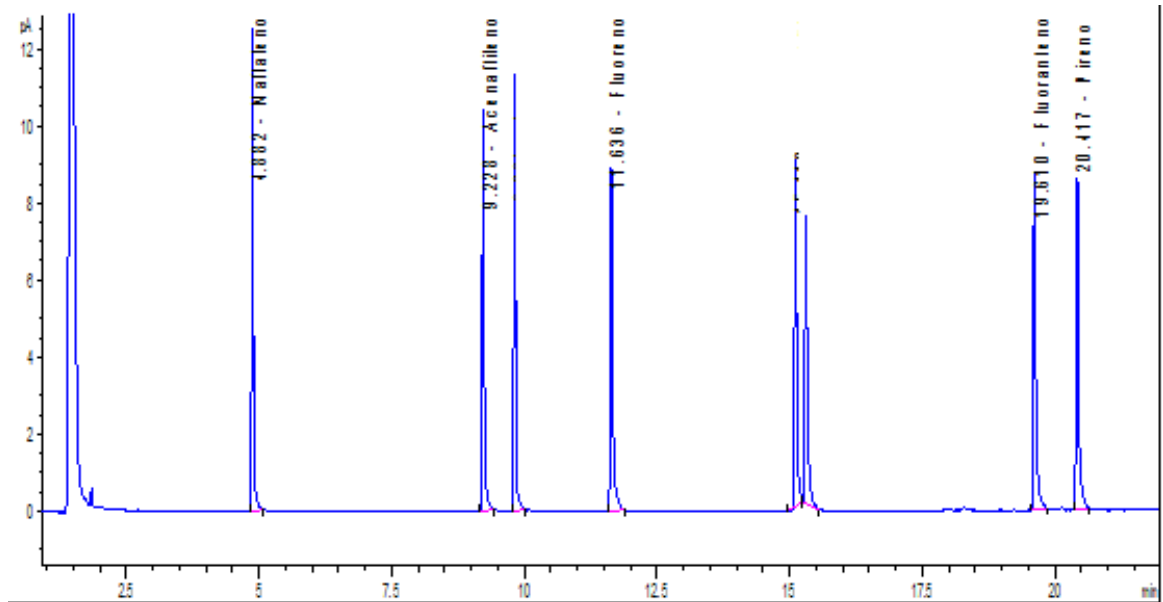
A continuación se presentan los resultados obtenidos en la validación del método 3550C y 8100 de la Norma EPA SW-846, para la determinación de 5 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en suelos de cortes de perforación de empresas petroleras, por cromatografía de gases (CG/FID), para contribuir en el alcance de los análisis en el laboratorio ChemiLab S.A.S., cumpliendo con todos los requisitos de calidad establecidas por la Norma ISO/IEC 17025.

6.1 IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

6.1.1 Curva Van Deemter

Obteniéndose el perfil cromatográfico (figura 12), con el fin de establecer un flujo óptimo en la columna, se realizó la curva de Van Deemter, para determinar la velocidad lineal óptima de la columna cromatográfica y su máxima eficiencia.

Figura 12. Perfil Cromatográfico de los HAP's en estudio



La tabla 8 muestra las alturas de los platos teóricos (H), de los analitos a diferentes velocidades lineales, se observa que μ es inversamente proporcional a H. En cromatografía de gases en especial utilizando columnas capilares se pueden obtener valores bajos de H por un periodo largo de diferentes velocidades lineales, la pendiente de la parte ascendente de la gráfica (grafica 11), después de haber alcanzado el mínimo, indica que con pendientes pequeñas se puede utilizar una mayor velocidad sin demasiada perdida de la eficiencia de la columna capilar y por tanto se aventaja un ahorro sustancial en el tiempo requerido para el análisis.

Tabla 8. Resultados Van Deemter

μ (cm/s)	Altura de plato teórico, H (cm)				
	Naftaleno	Acenaftileno	Fennatreno	Fluoreno	Pireno
15	0,2918	0,1318	0,0673	0,0934	0,0454
20	0,2303	0,1019	0,0498	0,0685	0,0328
25	0,1938	0,0832	0,0384	0,0574	0,0254
27	0,1756	0,0785	0,0362	0,0547	0,0235
28	0,1729	0,0747	0,0334	0,0532	0,0226
30	0,1649	0,0722	0,0348	0,0478	0,0215
32	0,1648	0,0692	0,0296	0,0470	0,0199
35	0,1549	0,0638	0,0302	0,0448	0,0208
40	0,1431	0,0592	0,0262	0,0395	0,0167
42	0,1435	0,0594	0,0262	0,0394	0,0174
45	0,1430	0,0583	0,0253	0,0380	0,0156
52	0,1388	0,0612	0,0268	0,0394	0,0154
55	0,1432	0,0640	0,0272	0,0412	0,0167
58	0,1402	0,0612	0,0286	0,0421	0,0166

Figura 13. Gráficas Van Deemter de HAP's

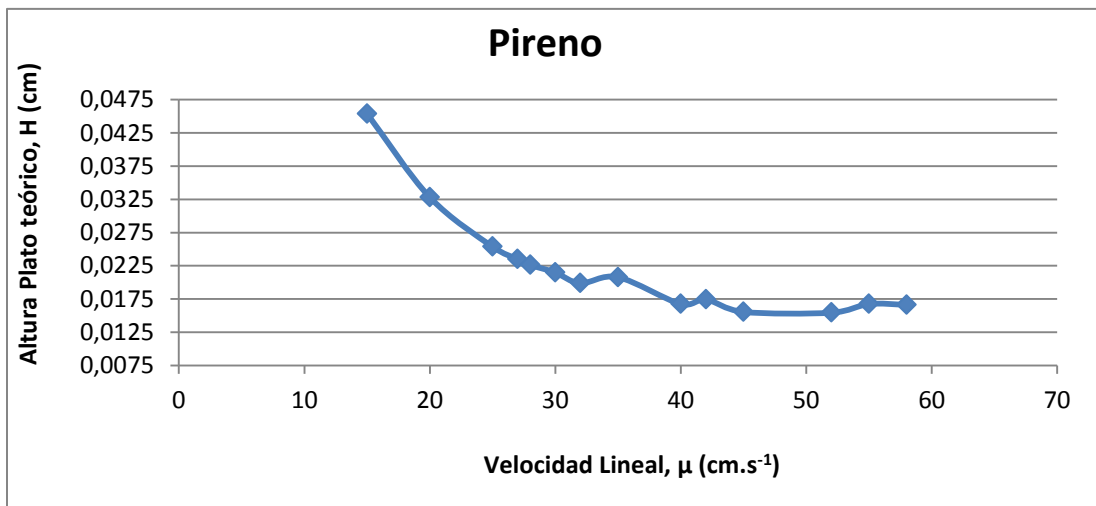
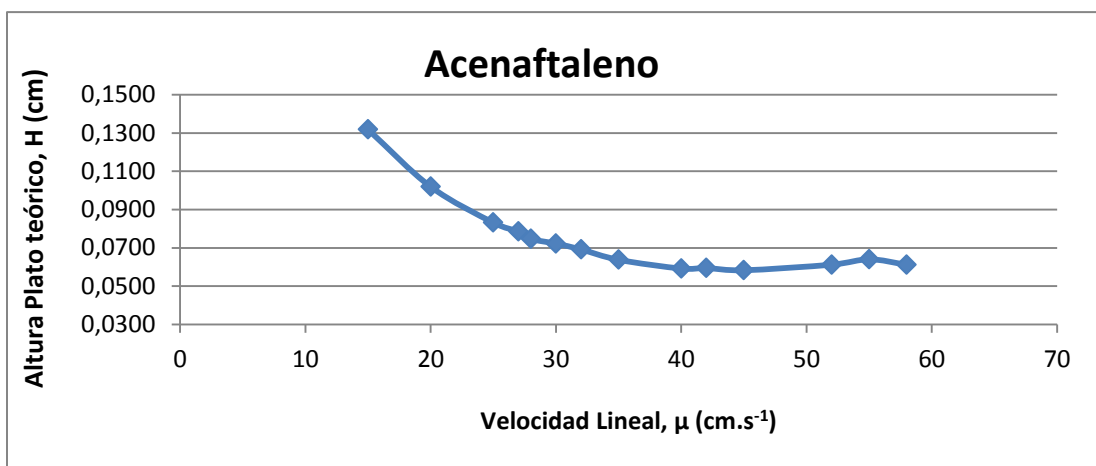
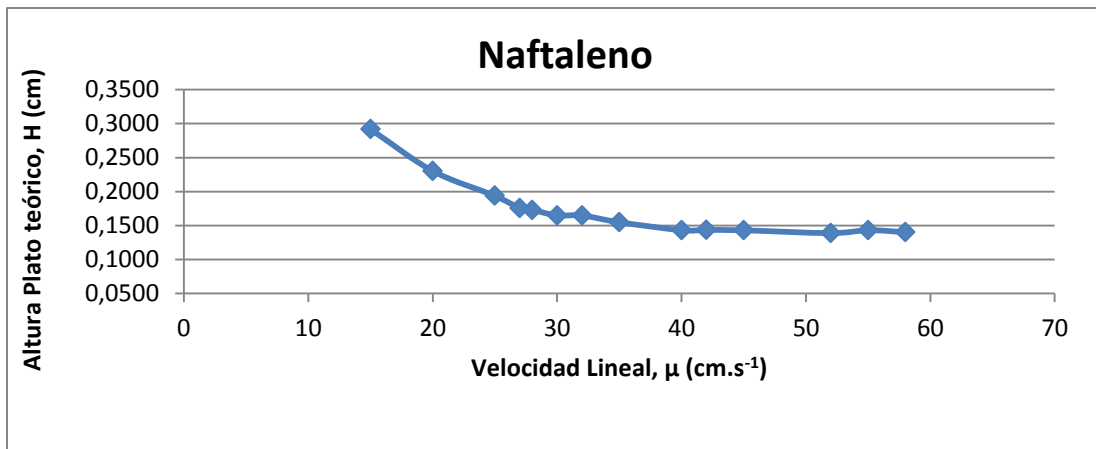
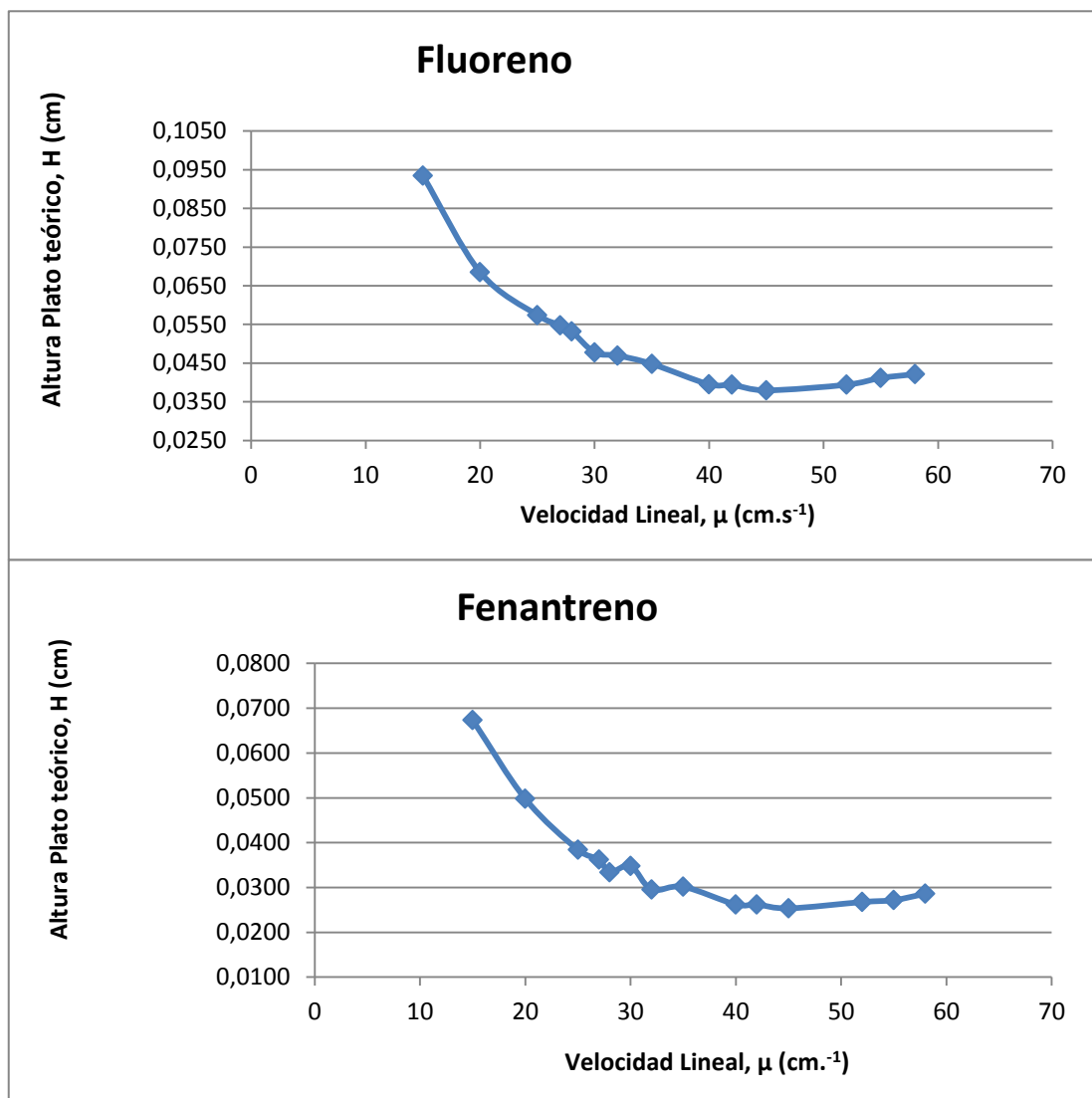


Figura 13. (Continuación)



En el rango de velocidades lineales de 35-58 cm.s⁻¹ se observa, como es característico de las columnas capilares, el rango amplio de trabajo para utilizar velocidades lineales altas sin dañar la eficiencia de la columna, pero se decide tomar el valor de 40 cm.s⁻¹ como el valor óptimo de la velocidad lineal como la máxima eficiencia de la columna capilar en la determinación de los 5 HAP's en estudio, ya que teniendo el histórico de muestras ingresadas al laboratorio cargadas en concentraciones no sólo de HAP's sino de otros hidrocarburos y resinas, es conveniente no saturar la columna con muestra y flujo para evitar el sangrado de la columna futuro.

6.1.2 Idoneidad cromatográfica

Para determinar la idoneidad del sistema cromatográfico se evaluaron distintos parámetros analíticos así como la comprobación de la precisión del sistema

realizando medidas repetidas de una misma preparación de muestra. En la tabla 9 se muestran los parámetros analíticos evaluados con sus respectivos criterios de aceptación.

Tabla 9. Criterios de aceptación para los parámetros cromatográficos.

Parámetros Evaluados	Criterio de Aceptación
Tiempo de retención (tr)	$CV \leq 20\%^{24}$
Factor de capacidad (K')	Entre 1,5 y 10
Resolución	≥ 2
Platos teóricos (N)	≥ 2000
Factor de selectividad	≥ 1

En la tabla 10 se recopilan los parámetros cromatográficos determinados experimentalmente para los 5 HAP's.

Tabla 10. Resultados de los parámetros cromatográfico

Estadístico	Naftaleno	Naftaleno	Naftaleno	Naftaleno	Naftaleno
tr (min)	5,163	9.615	12.040	15.526	20.839
K'	2,977	6.407	8.275	10.961	15.054
N	7136124	16776296	25107968	38028390	59132368
Resolución	N.A	90.098	34.009	61.354	13.338
Factor de selectividad	N.A	2.152	1.204	1.325	1.043

En la tabla 10 se puede observar que los tiempos de retención para cada sustancia analizada presenta un coeficiente inferior al 20% lo cual es aceptado por la metodología 8000 de la EPA.

El factor de capacidad para cada analito cumple con el criterio de aceptación, ya que este valor se encuentra dentro del rango establecido. La K', indica la efectividad de separación de las moléculas, lo ideal debe ser entre 1,5 y 10 porque valores muy grandes, indican alta retención del analito en la fase estacionaria, demasiada interacción y genera ensanchamiento de las bandas.

El número de platos teóricos para cada analito es significativamente alto lo cual indica que se presentó un buen número de equilibrios, cumpliendo de esta manera con el criterio de aceptación, mientras que la columna capilar tenga gran cantidad de platos teóricos, la eficiencia cromatográfica se va a ver favorecida.

En cuanto a la resolución, la mayoría de los analitos alcanza el valor ideal, (> 2)

El factor de selectividad se cumple para todos los analitos puesto que este valor es superior a 1.

Con los resultados obtenidos se puede considerar que el equipo funciona correctamente y que la determinación se realizó en las condiciones establecidas durante la validación, lo cual indica que el sistema cromatográfico es idóneo y específico y no hay problema con la eficiencia cromatográfica.

6.1.2.1 Especificidad

Los datos de especificidad se relacionan en la tabla 11, en donde se observa adecuada especificidad ya que cada analito presenta un tiempo de retención diferente; por lo tanto no hay interferencias para la correcta identificación de los compuestos de interés

Tabla 11. Tiempos de retención de cada HAP's.

Hidrocarburo Aromático Policíclico	Tiempo de Retención (min)
Naftaleno	5,044
Acenaftaleno	9,471
Fluoreno	11,892
Fenantreno	15,379
Pireno	20,699

6.1.2.2 Linealidad instrumental

Se evaluaron 5 niveles de concentración durante 7 días diferentes para cada compuesto. Se preparó una curva de calibración por día, los resultados se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados para la evaluación de la linealidad instrumental en la determinación de HAP's en suelos

HAP's	Día	2 mg.L ⁻¹ (N1)	5 mg.L ⁻¹ (N2)	10 mg.L ⁻¹ (N3)	20 mg.L ⁻¹ (N4)	70 mg.L ⁻¹ (N5)
Área de pico						
Naftaleno	1	1,40	5,93	13,2	26,5	101
	2	1,35	5,93	13,1	26,2	102
	3	1,30	6,25	13,9	25,8	104
	4	1,32	6,22	13,8	26,5	104
	5	1,33	5,60	11,2	26,1	95,0
	6	1,50	5,20	11,5	26,3	92,0
	7	1,57	5,70	11,3	26,1	93,0
Acenaftaleno	1	1,65	6,13	14,1	31,2	110
	2	1,67	6,24	14,0	31,5	112
	3	1,75	6,54	14,7	31,9	114
	4	1,76	6,52	14,7	32,0	114
	5	1,29	6,51	12,9	29,2	109
	6	1,32	6,51	13,3	28,9	109
	7	1,43	6,70	13,2	29,6	110
Fenantreno	1	1,59	6,72	15,1	32,5	122
	2	1,40	6,70	15,0	32,7	122
	3	1,85	7,32	16,2	34,0	125
	4	1,80	7,31	16,2	34,1	125
	5	1,76	7,45	16,7	30,8	120
	6	1,69	7,45	16,7	30,0	121
	7	1,29	7,14	15,6	30,9	120

Tabla 12. (Continuación)

HAP's	Día	2 mg.L ⁻¹ (N1)	5 mg.L ⁻¹ (N2)	10 mg.L ⁻¹ (N3)	20 mg.L ⁻¹ (N4)	70 mg.L ⁻¹ (N5)
Área de pico						
Fluoreno	1	1,34	6,63	15,2	30,7	119
	2	1,35	6,72	15,1	30,7	120
	3	1,32	7,06	15,8	30,4	121
	4	1,32	7,05	15,8	30,4	122
	5	1,20	6,95	15,5	30,0	120
	6	1,38	6,85	15,6	31,1	121
	7	1,22	6,71	16,0	30,6	121
Pireno	1	1,30	6,45	17,0	34,2	133
	2	1,35	6,46	16,8	34,3	134
	3	1,30	7,93	17,6	35,2	136
	4	1,35	7,89	17,6	35,2	136
	5	1,25	7,65	16,5	35,1	135
	6	1,28	7,22	17,4	35,2	133
	7	1,32	6,92	16,4	34,5	132

Se realizan una serie de pruebas con el paquete estadístico SPSS planteando siempre dos hipótesis: Una hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alternativa (H_a). Con base en el valor de significancia (p), se acepta o rechaza la H_0 , de acuerdo a si este valor es superior, igual o menor de 0,05 respectivamente. Si se rechaza la hipótesis nula, se debe aceptar la alternativa en cada prueba.

Con los datos de la tabla 12 se calcula la normalidad de los mismos en función del nivel de concentración con la prueba de Shapiro-Wilk, encontrando que los resultados provienen de una población con distribución normal en función del nivel de concentración con una significancia estadística superior a 0,05 (Anexo A, tabla 1).

Se aplica la prueba ANOVA para saber si existen diferencias significativas entre las medias de los valores de las áreas de cada uno de los 5 niveles de concentración. Los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. ANOVA de área para linealidad instrumental del método de HAP's por CG/FID en función del nivel de concentración

HAP's		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Naftaleno	Inter-grupos	44883,944	4	11220,986	2046,482	0,000
	Intra-grupos	164,492	30	5,483	--	--
	Total	45048,436	34	--	--	--
Acenaftaleno	Inter-grupos	57154,132	4	14288,533	10379,740	0,000
	Intra-grupos	41,297	30	1,377	--	--
	Total	57195,429	34	--	--	--
Fenantreno	Inter-grupos	69123,811	4	17280,953	10212,738	0,000
	Intra-grupos	50,763	30	1,692	--	--
	Total	69174,573	34	--	--	--

Tabla 13. (Continuación)

HAP's		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fluoreno	Inter-grupos	67454,816	4	16863,704	61869,589	0,000
	Intra-grupos	8,177	30	0,273	--	--
	Total	67462,993	34	--	--	--
Pireno	Inter-grupos	83711,233	4	20927,808	28272,621	0,000
	Intra-grupos	22,206	30	0,740	--	--
	Total	83733,439	34	--	--	--

El resultado obtenido indica que existe diferencia significativa en los valores del área en función del nivel de concentración. La prueba de Homogeneidad de varianzas ($p < 0.05$), permite establecer que éstas no son homogéneas y por tanto se aplica la prueba de Bonferroni para saber entre cuáles niveles de concentración hay diferencia significativa, (Anexo B, tabla 1). Se aprecia que el área de cada nivel de concentración es significativamente diferente, el incremento en el nivel de concentración produce incremento proporcional del área, indicando la relación directa entre área y concentración.

Cuando se considera el día como variable independiente, la normalidad de estos resultados ($p > 0,05$) (Anexo A, tabla 2), permitió aplicar pruebas paramétricas para su correspondiente análisis estadístico, la prueba de ANOVA, tabla 14 muestra valores de significancia mayores a 0,05 ($p > 0,05$), indicando que no hay diferencia significativa en los valores de área en función del día, mostrando la reproducibilidad del método.

Tabla 14. ANOVA de área para linealidad instrumental del método de HAP's por CG/FID en función del día.

HAP's		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Naftaleno	Inter-grupos	40,234	6	6,706	0,004	1,000
	Intra-grupos	45008,202	28	1607,436	---	---
	Total	45048,436	34	---	---	---
Acenaftaleno	Inter-grupos	3,699	6	0,616	0,000	1,000
	Intra-grupos	57191,730	28	2042,562	---	---
	Total	57195,429	34	---	---	---
Fenantreno	Inter-grupos	2,879	6	0,480	0,000	1,000
	Intra-grupos	69171,694	28	2470,418	---	---
	Total	69174,573	34	---	---	---
Fluoreno	Inter-grupos	1,443	6	0,240	0,000	1,000
	Intra-grupos	67461,550	28	2409,341	--	--
	Total	67462,993	34	---	---	---
Pireno	Inter-grupos	5,280	6	0,880	0,000	1,000
	Intra-grupos	83728,159	28	2990,291	---	---
	Total	83733,439	34	---	---	---

De acuerdo a los resultados obtenidos se demuestra la reproducibilidad de los datos. La tendencia de los datos se evaluó a través de un gráfico relacionando el área del pico cromatográfico en función del nivel de concentración, las gráficas obtenidas se muestran en la figura 14 donde se observa la tendencia lineal de los resultados, por lo que se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal que relaciona la cantidad de cada HAP's con el área de pico cromatográfico.

Figura. 14. Curvas de calibración bajo condiciones de precisión intermedia

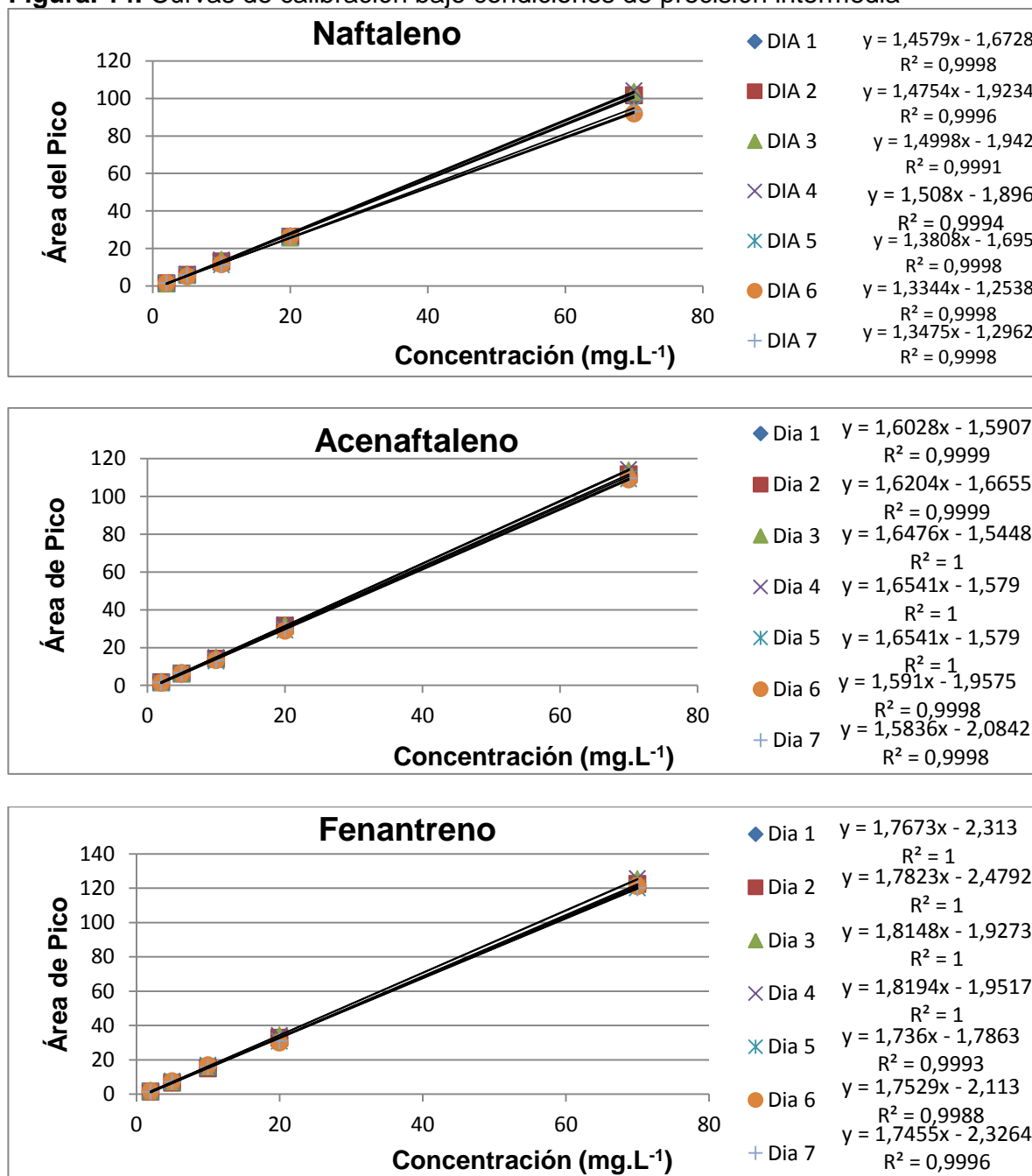
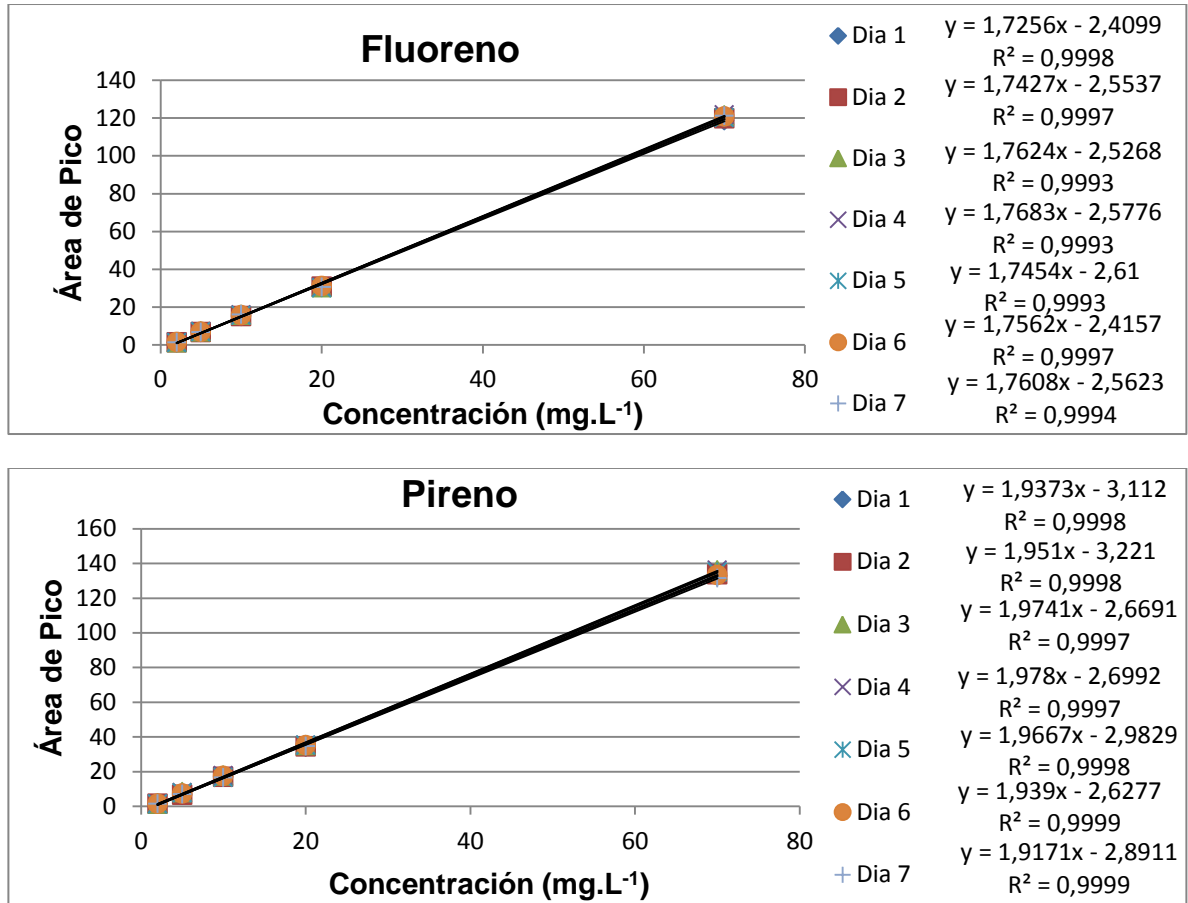


Figura 14. (Continuación)



Se calcularon los valores para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y sus correspondientes desviaciones estándar, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Evaluación de la linealidad instrumental experimentalmente.

Parámetro	Símbolo	Naftaleno	Acenaftaleno	Fenantreno	Fluoreno	Pireno
Coefficiente de correlación	R	0,9998	0,9999	0,9998	0,9997	0,9999
Pendiente	b	1,4291	1,6127	1,7740	1,7516	1,9519
Intercepto	a	-1,6685	-1,8034	-2,1281	-2,5223	2,8861
Desviación estándar para el intercepto	s _a	0,2895	0,2719	0,2534	0,0789	0,2314
Desviación estándar para la pendiente	s _b	0,0732	0,0287	0,0330	0,0147	0,0223

El coeficiente de correlación se evaluó para todos los HAP's estadísticamente teniendo como hipótesis nula: "No existe correlación entre x e y". Como se observa en la tabla 16, la prueba de Pearson es significativa (Sig. 0,000), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe correlación significativa entre la concentración de los HAP's y la respuesta brindada por el equipo (áreas de los picos cromatográficos).

Tabla 16. Resultados obtenidos en la evaluación estadística del coeficiente de Correlación de Pearson.

Compuestos	Relación	Parámetro	NIVEL (mg.L ⁻¹)	Área de Pico
Naftaleno	Concentración (mg.L ⁻¹)	Correlación de Pearson	1	0,998
		Sig. (bilateral)	---	0,000
		N	35	35
	Area de pico cromatográfico	Correlación de Pearson	0,998	1
		Sig. (bilateral)	0,000	---
		N	35	35
Acenaftaleno	Concentración (mg.L ⁻¹)	Correlación de Pearson	1	1,000
		Sig. (bilateral)	---	0,000
		N	35	35
	Area de pico cromatográfico	Correlación de Pearson	1,000	1
		Sig. (bilateral)	0,000	---
		N	35	35
Fenantreno	Concentración (mg.L ⁻¹)	Correlación de Pearson	1	1,000
		Sig. (bilateral)	---	,000
		N	35	35
	Area de pico cromatográfico	Correlación de Pearson	1,000	1
		Sig. (bilateral)	0,000	---
		N	35	35
Fluoreno	Concentración (mg.L ⁻¹)	Correlación de Pearson	1	1,000
		Sig. (bilateral)	---	0,000
		N	35	35
	Area de pico cromatográfico	Correlación de Pearson	1,000	1
		Sig. (bilateral)	0,000	---
		N	35	35

Tabla 16. (Continuación)

Compuestos	Relación	Parámetro	NIVEL (mg.L ⁻¹)	Área de Pico
Pireno	Concentración (mg.L ⁻¹)	Correlación de Pearson	1	1,000
		Sig. (bilateral)	---	0,000
		N	35	35
	Area de pico cromatográfico	Correlación de Pearson	1,000	1
		Sig. (bilateral)	0,000	---
		N	35	35

Para evaluar estadísticamente la pendiente y el intercepto se tienen las siguientes hipótesis:

- Para la pendiente se tiene como Ho: “b no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. < 0,05.
- Para el intercepto se tiene como Ho: “a no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. < 0,05.

Como se observa en la tabla 17 la significancia estadística tanto para la pendiente como para el intercepto son inferiores a 0,05, por lo que se deben rechazar las hipótesis nulas, y concluir que la pendiente y el intercepto son significativamente diferentes de cero en cada compuesto.

Tabla 17. Resultados obtenidos en la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto.

Compuesto		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	T	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		b	Error Est.				Beta	Límite inferior
Naftaleno	intercepto	-1,668	0,504		-3,314	0,002	-2,693	-,644
	Pendiente	1,429	0,015	0,998	93,52	0,000	1,398	1,460
Acenaftaleno	intercepto	-1,803	0,255		-7,067	0,000	-2,323	-1,284
	Pendiente	1,613	0,008	1,000	208,2	0,000	1,597	1,628
Fenantreno	intercepto	-2,128	0,307		-6,925	0,000	-2,753	-1,503
	Pendiente	1,773	0,009	1,000	190,2	0,000	1,754	1,792
Fluoreno	intercepto	2,522	0,248		-10,15	0,000	-3,027	-2,017
	Pendiente	1,752	0,008	1,000	232,4	0,000	1,736	1,767
Pireno	intercepto	-2,866	0,241		-11,90	0,000	-3,356	-2,377
	Pendiente	1,952	0,007	1,000	267,1	0,000	1,937	1,966

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se evaluó estadísticamente la regresión en la curva de calibración de los HAP's, los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Análisis de varianza para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración

Compuesto		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Naftaleno	Regresión	44879,120	1	44879,120	8747,039	0,000
	Residual	169,316	33	5,131	---	---
	Total	45048,436	34	---	---	---
Acenaftaleno	Regresión	57151,939	1	57151,939	43366,283	0,000
	Residual	43,490	33	1,318	---	---
	Total	57195,429	34	---	---	---
Fenantreno	Regresión	69111,518	1	69111,518	36169,377	0,000
	Residual	63,056	33	1,911	---	---
	Total	69174,573	34	---	---	---
Fluoreno	Regresión	67421,825	1	67421,825	54044,227	0,000
	Residual	41,169	33	1,248	---	---
	Total	67462,993	34	---	---	---
Pireno	Regresión	83694,729	1	83694,729	71348,854	0,000
	Residual	38,710	33	1,173	---	---
	Total	83733,439	34	---	---	---

Para evaluar la regresión se tiene como hipótesis nula: “No hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$)”, y como hipótesis alternativa “Hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$)”. Como se observa en la tabla No 18, la significancia para la regresión es menor de 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe diferencia significativa en los valores del Área de las concentraciones de cada hidrocarburo aromático policíclico.

Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permiten concluir que los métodos instrumentales empleados para cada HAP son lineales en los rangos de cada una de las curvas, con un coeficiente de correlación superior a 0,995 como lo exige la metodología EPA 8000 ($r > 0,99$)²⁴ en análisis cromatográficos.

6.1.2.3 Precisión Instrumental

Se evaluó bajo condiciones de repetitividad (el mismo día) y precisión intermedia (días diferentes). En condiciones de repetitividad se prepararon 3 curvas de calibración con 5 niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de repetitividad

HAP's	Replica	2 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹	10 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	70 mg.L ⁻¹
		(N1)	(N2)	(N3)	(N4)	(N5)
Área de pico cromatográfico						
Naftaleno	1	1,40	5,86	13,2	26,0	100
	2	1,40	5,93	13,2	26,5	101
	3	1,35	5,93	13,1	26,2	102
Acenaftaleno	1	2,00	6,20	14,1	31,0	110
	2	1,65	6,13	14,1	31,2	110
	3	1,67	6,24	14,0	31,5	112
Fenantreno	1	1,60	6,82	15,3	32,7	121
	2	1,59	6,72	15,1	32,5	122
	3	1,40	6,70	15,0	32,7	122
Fluoreno	1	1,33	6,76	15,1	30,7	118
	2	1,34	6,63	15,2	30,7	119
	3	1,35	6,72	15,1	30,7	120
Pireno	1	1,25	6,43	17,1	34,3	132
	2	1,30	6,45	17,0	34,2	133
	3	1,35	6,46	16,8	34,3	134

Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon 7 curvas de calibración durante 7 días diferentes, una curva de calibración por día, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 20.

Tabla 20. Curvas de calibración bajo condiciones de precisión intermedia.

HAP's	DIA	2 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹	10 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	70 mg.L ⁻¹
		(N1)	(N2)	(N3)	(N4)	(N5)
Área de Pico cromatográfico						
Naftaleno	1	1,40	5,93	13,2	26,5	101
	2	1,35	5,93	13,1	26,2	102
	3	1,30	6,25	13,9	25,8	104
	4	1,32	6,22	13,8	26,5	104
	5	1,33	5,60	11,2	26,1	95,0
	6	1,50	5,20	11,5	26,3	92,0
	7	1,57	5,70	11,3	26,1	93,0
Acenaftaleno	1	1,65	6,13	14,1	31,2	110
	2	1,67	6,24	14,0	31,5	112
	3	1,75	6,54	14,7	31,9	114
	4	1,76	6,52	14,7	32,0	114
	5	1,29	6,51	12,9	29,2	109
	6	1,32	6,51	13,3	28,9	109
	7	1,43	6,70	13,2	29,6	110
Fenantreno	1	1,59	6,72	15,1	32,5	122
	2	1,40	6,70	15,0	32,7	122
	3	1,85	7,32	16,2	34,0	125
	4	1,80	7,31	16,2	34,1	125
	5	1,76	7,45	16,7	30,8	120
	6	1,69	7,45	16,7	30,0	121
	7	1,29	7,14	15,6	30,9	120

Tabla 20. (Continuación)

HAP's	DIA	2 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹	10 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	70 mg.L ⁻¹
		(N1)	(N2)	(N3)	(N4)	(N5)
Área de Pico cromatográfico						
Fluoreno	1	1,34	6,63	15,2	30,7	119
	2	1,35	6,72	15,1	30,7	120
	3	1,32	7,06	15,8	30,4	121
	4	1,32	7,05	15,8	30,4	122
	5	1,20	6,95	15,5	30,0	120
	6	1,38	6,85	15,6	31,1	121
	7	1,22	6,71	16,0	30,6	121
Pireno	1	1,30	6,45	17,0	34,2	133
	2	1,35	6,46	16,8	34,3	134
	3	1,30	7,93	17,6	35,2	136
	4	1,35	7,89	17,6	35,2	136
	5	1,25	7,65	16,5	35,1	135
	6	1,28	7,22	17,4	35,2	133
	7	1,32	6,92	16,4	34,5	132

Se calculó el % C.V por nivel de concentración bajo condiciones de repetitividad y precisión intermedia. Los resultados se presentan en la tabla 21. Como se observa los % C.V son bajos, inferiores al 20% aceptado por el método 8000 de la EPA, tanto en términos de repetibilidad como de precisión intermedia, indicando que los métodos son altamente reproducibles, precisos y exactos para la determinación de todos los hidrocarburos aromáticos policíclicos analizados.

Tabla 21. Precisión instrumental bajo condiciones de repetitividad y precisión intermedia

HAP's	Nivel	REPETIBILIDAD			PRECISIÓN INTERMEDIA		
		Promedio	Desv. Est	%CV	Promedio	Desv. Est	%CV
Naftaleno	1	1,38	0,029	2,09	1,40	0,102	7,32
	2	5,91	0,040	0,684	5,83	0,369	6,32
	3	13,2	0,058	0,438	12,6	1,20	9,52
	4	26,2	0,252	0,959	26,2	0,248	0,945
	5	101	1,00	0,990	98,7	5,22	5,29
Acenaftaleno	1	1,77	0,197	11,1	1,55	0,201	13,0
	2	6,19	0,056	0,899	6,45	0,195	3,03
	3	14,1	0,058	0,410	13,8	0,740	5,35
	4	31,2	0,252	0,806	30,6	1,33	4,34
	5	111	1,15	1,04	111	2,12	1,91
Fenantreno	1	1,53	0,113	7,37	1,63	0,211	13,0
	2	6,75	0,064	0,953	7,16	0,322	4,50
	3	15,1	0,153	1,01	15,9	0,706	4,44
	4	32,6	0,115	0,354	32,1	1,62	5,03
	5	122	0,577	0,475	122	2,12	1,73
Fluoreno	1	1,34	0,01	0,746	1,30	0,068	5,20
	2	6,70	0,067	0,993	6,85	0,173	2,52
	3	15,1	0,058	0,382	15,6	0,330	2,12
	4	30,7	0,000	0,000	30,6	0,341	1,12
	5	119	1,00	0,840	121	0,976	0,809

Tabla 21. (Continuación)

HAP's	Nivel	REPETIBILIDAD			PRECISIÓN INTERMEDIA		
		Promedio	Desv. Est	%CV	Promedio	Desv. Est	%CV
Pireno	1	1,3	0,05	3,85	1,31	0,036	2,78
	2	6,45	0,015	0,237	7,22	0,632	8,76
	3	17,0	0,153	0,900	17,0	0,503	2,95
	4	34,3	0,058	0,168	34,8	0,460	1,32
	5	133	1,00	0,752	134	1,57	1,17

6.1.3 Límites críticos

Los límites de detección y cuantificación se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC. Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones (tabla 19), con los resultados se elaboró un gráfico que relaciona el área y la concentración, el cual se ilustra en la figura 15, observando una tendencia lineal entre las dos variables para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases.

Con los datos obtenidos se calculó mediante el método de mínimos cuadrados las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo de esta forma los interceptos y las pendientes para cada una de las tres curvas de calibración, con estos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos ($S_{interceptos}$) y el promedio de las pendientes ($m_{promedio}$). Finalmente se aplicaron las ecuaciones 4 y 5 para establecer teóricamente los valores para los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) respectivamente, los resultados se muestran en la tabla 22

Figura 15 Curvas de calibración para la determinación de límites críticos

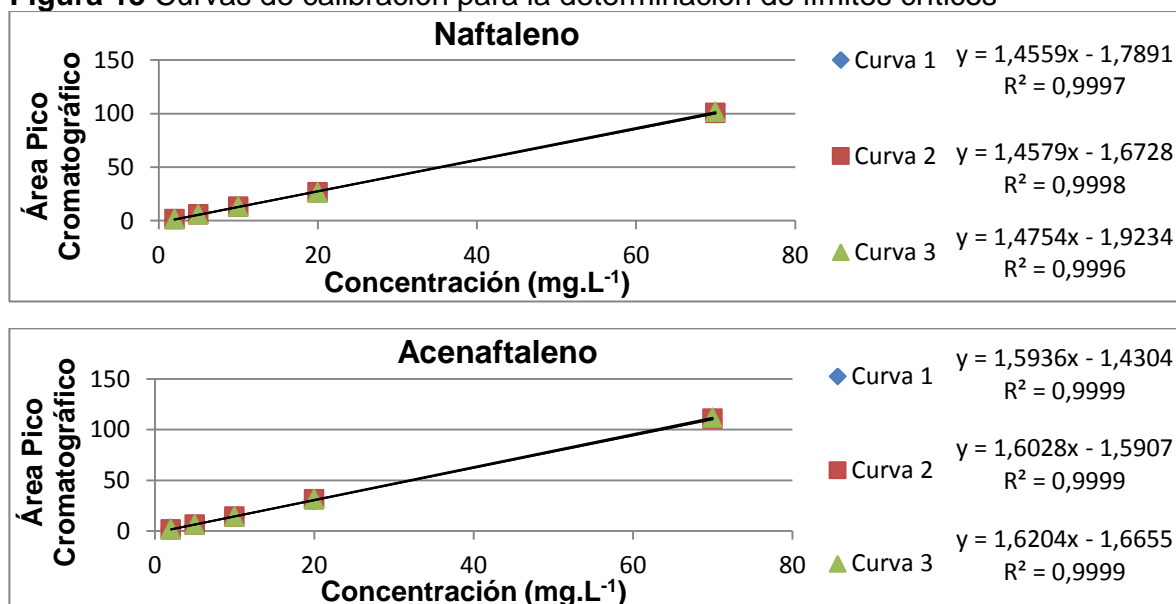


Figura 15. (Continuación)

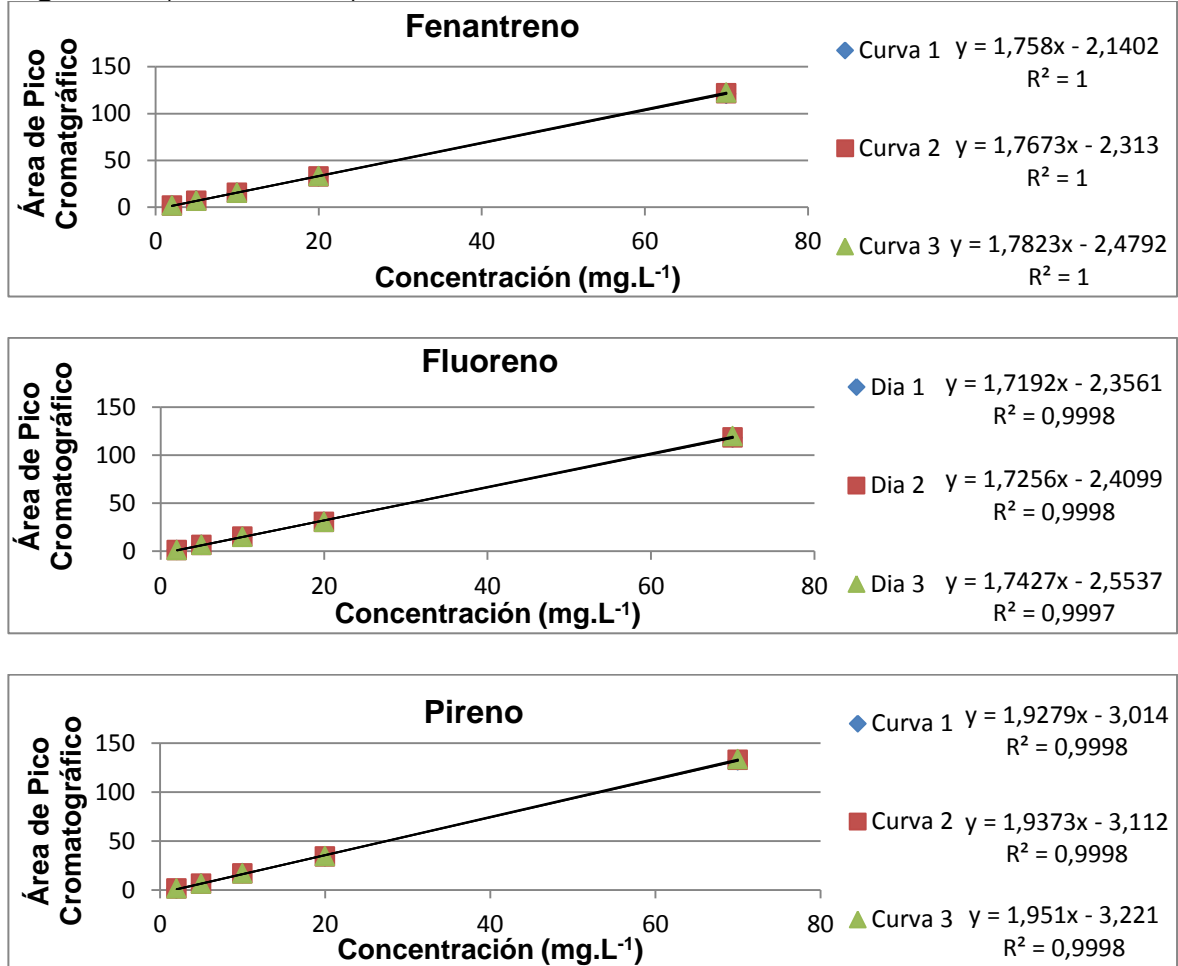


Tabla 22. Cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

HAP's		CURV A 1	CURV A 2	CURVA 3	S Intercepto	m prom	LOD (mg·L ⁻¹)	LOQ (mg·L ⁻¹)
Naftaleno	Pendiente	1,456	1,458	1,475	0,125	1,463	0,257	0,857
	Intercepto	-1,789	-1,673	-1,923				
Acenaftalen o	Pendiente	1,594	-1,430	1,594	0,120	1,606	0,224	0,748
	Intercepto	1,603	-1,591	1,603				
Fenantreno	Pendiente	1,758	-2,140	1,758	0,170	1,769	0,287	0,958
	Intercepto	1,767	-2,313	1,767				
Fluoreno	Pendiente	1,719	-2,356	1,719	0,102	1,729	0,177	0,591
	Intercepto	1,726	-2,410	1,726				
Pireno	Pendiente	1,928	-3,014	1,928	0,104	1,939	0,160	0,534
	Intercepto	1,937	-3,112	1,937				

El límite crítico LOQ determinado teóricamente no se pudo evaluar experimental ya que el pico cromatográfico es demasiado pequeño y muy cerca a la señal del ruido de

fondo del instrumento, por ésta razón no fue conveniente cuantificarlo y si se realizaba, se contribuía a una mala práctica en cromatografía. Los LOQ's teóricos tan bajos se debe en gran parte a la buena sensibilidad del detector FID, representadas en la pendientes, lo cual se hablará más adelante.

Como LOQ, se estableció el primer nivel de la curva de calibración, para poder cuantificarlo de manera exacta y precisa, preparando 7 réplicas de muestras de arena dopada ($0,4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), obteniendo una concentración de $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el extracto de suelo (primer nivel de la curva de calibración). Estas muestras se analizaron de acuerdo a la metodología descrita, para el análisis de muestras por ultrasonido y cuantificación por CG/FID. Los valores del área de pico cromatográfico se promediaron e interpolaron en una curva de calibración preparada y analizada el mismo día, con estos resultados se halló la precisión y la exactitud de los LOQ's como se muestra en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados para la determinación experimental de LOQ.

HAP's	Área de pico cromatográfico	Concentración	Concentración	% R	% C.V
		Teórica ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Experimental ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
Naftaleno	1,40	2,00	2,11	105	2,42
	1,35	2,00	2,22	111	
	1,30	2,00	2,16	108	
	1,32	2,00	2,13	107	
	1,33	2,00	2,19	110	
	1,50	2,00	2,06	103	
	1,57	2,00	2,13	106	
Acenaftaleno	1,65	2,00	2,02	101	3,67
	1,67	2,00	2,06	103	
	1,75	2,00	2,00	100	
	1,76	2,00	2,02	101	
	1,29	2,00	2,20	110	
	1,32	2,00	2,15	108	
	1,43	2,00	2,13	106	
Fenantreno	1,59	2,00	2,21	110	3,13
	1,40	2,00	2,18	109	
	1,85	2,00	2,08	104	
	1,80	2,00	2,06	103	
	1,76	2,00	2,04	102	
	1,69	2,00	2,17	109	
	1,29	2,00	2,07	104	
Fluoreno	1,34	2,00	2,17	109	1,40
	1,35	2,00	2,24	112	
	1,32	2,00	2,18	109	
	1,32	2,00	2,21	110	
	1,20	2,00	2,18	109	
	1,38	2,00	2,16	108	
	1,22	2,00	2,15	107	
Pireno	1,30	2,00	2,28	114	6,08
	1,35	2,00	2,34	117	
	1,30	2,00	2,01	101	
	1,35	2,00	2,05	102	
	1,25	2,00	2,15	108	
	1,28	2,00	2,02	101	
	1,32	2,00	2,20	110	

Como se observa el sistema instrumental brinda una exactitud y precisión adecuadas al LOQ con un %C.V. menores del 20% y %R entre 70-130%, criterios de aceptación del método 8000 de la EPA aplicado a métodos cromatográficos.

6.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HAP's EN SUELOS DE CORTES DE PERFORACIÓN

6.2.1 Elección procedimiento de extracción

La mejor metodología de extracción fue seleccionada analizando estadísticamente los %R (tabla 24) obtenidos con la prueba de distribución t de student.

Tabla 24. Porcentajes de recuperación obtenidos en los dos métodos de extracción de los HAP's en suelos.

Método de Extracción	Naftaleno	Acenaftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
Ultrasonido	82,8	92,7	94,7	97,8	101
	85,1	93,2	94,1	97,4	100
	85,7	93,1	94,3	98,2	101
	86,6	95,0	96,0	99,2	102
	84,7	94,0	94,2	97,6	100
	82,8	92,7	94,7	97,8	101
	85,1	93,2	94,1	97,4	100
	85,7	93,1	94,3	98,2	101
	86,6	95,0	96,0	99,2	102
	84,7	94,0	94,2	97,6	100
Soxhlet	51,4	73,1	76,8	82,6	92,6
	53,3	73,9	75,2	84,3	94,6
	47,7	69,9	72,8	78,7	86,0
	51,4	77,7	81,6	88,7	97,6
	49,6	72,8	78,7	85,1	93,0
	51,4	73,1	76,8	82,6	92,6
	53,3	73,9	75,2	84,3	94,6
	47,7	69,9	72,8	78,7	86,0
	51,4	77,7	81,6	88,7	97,6
	49,6	72,8	78,7	85,1	93,0

La prueba de Levene para la igualdad de varianzas, nos indica, si podemos o no suponer varianzas iguales. En la tabla 25 se muestra para todos los casos la probabilidad asociada al estadístico Levene la cual es >0.05 , de ésta manera suponemos que las variables en las dos metodologías son de varianzas iguales. Después de asumir las varianzas iguales observamos el estadístico t con su nivel de significación bilateral, este valor nos informa sobre el grado de compatibilidad entre la hipótesis de igualdad de medias y las diferencia entre medias poblacionales observadas; en nuestro caso es menor que 0.05, la conclusión es que no hay compatibilidad entre la hipótesis de igualdad de medias poblacionales y las diferencias entre las medias de grupos representados por grupo con ultrasonido y grupo con soxhlet. Las medidas de los %R de ultrasonido son diferentemente significativas para

el grupo con %R con soxhlet. De acuerdo a lo anterior se obtienen mejores resultados de HAP's con extracción ultrasónica, la cual es la metodología seleccionada para el proceso de validación.

Tabla 25. Estadístico de Levene para la elección del procedimiento de extracción.

Compuesto	Ho	Prueba de Levene de calidad de varianzas		Prueba t para igualdad de medias		
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)
Naftaleno	Se asumen varianzas iguales	2,415	0,138	45,285	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	45,285	15,733	0,000
Acenaftaleno	Se asumen varianzas iguales	3,745	0,069	22,760	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	22,760	10,966	0,000
Fluoreno	Se asumen varianzas iguales	11,983	0,053	17,039	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	17,039	9,936	0,000
Fenantreno	Se asumen varianzas iguales	9,555	0,056	12,730	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	12,730	9,641	0,000
Pireno	Se asumen varianzas iguales	5,812	0,057	6,235	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	6,235	9,836	0,000

6.2.2 Elección solvente de extracción

El solvente para la extracción de los HAP's en suelos, fue seleccionado analizando estadísticamente los %R (tabla 26) obtenidos con la prueba de distribución t de student.

Tabla 26. Porcentajes de recuperación en la prueba de afinidad del solvente

Método de Extracción	Naftaleno	Acenaftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
	106	114	116	118	119
	107	116	116	119	119
	107	115	116	119	119
	107	115	116	118	119
Mezcla de Solvente:	109	118	119	122	122
Acetona/Diclorometano	108	116	117	120	120
1:1	109	119	120	122	123
	107	115	116	119	119
	110	118	119	122	122
	111	120	121	124	124

Tabla 26. (Continuación)

Método de Extracción	Naftaleno	Acenaftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
Tetracloroetileno (Solvent-IR)	68,7	64,3	112	117	113
	68,8	64,5	112	118	114
	68,5	64,8	112	118	113
	68,5	64,8	112	118	113
	69,0	65,3	113	119	114
	68,7	65,3	113	118	114
	68,5	64,8	112	118	113
	68,8	64,5	112	118	114
	68,7	64,3	112	117	113
	69,0	65,3	113	119	114

En vista de los resultados que obtenemos decidimos rechazar la hipótesis nula de que las varianzas de error para ambos grupos son iguales, dado que la probabilidad de equivocarnos al aceptar en cada caso es muy inferior al límite del 0,05. En nuestro caso y como anteriormente hemos rechazado la hipótesis nula para la prueba de Levene debemos optar por el resultado de “no se asumen varianzas iguales”, como podemos comprobar nos lleva a rechazar la hipótesis nula de que en la población las medias de ambos grupos son iguales, pues la probabilidad en todos los casos (sig bilateral), es inferior al 0,5. Los %R generados en la extracción ultrasónica de HAP's en suelos de cortes de perforación petrolera difieren significativamente. Observando la tabla 27, los mejores recuperados se obtiene utilizando la mezcla de Solvente: Acetona/Diclorometano 1:1, la cual es seleccionada para la validación de la metodología.

Tabla 27. Estadístico de Levene, elección de solvente

Compuesto	Ho	Prueba de Levene de calidad de varianzas		Prueba t para igualdad de medias		
		F	Sig	t	gl	Sig bilateral
Naftaleno	Se asumen varianzas iguales	22,288	0,000	77,536	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	77,536	9,24	0,000
Acenaftaleno	Se asumen varianzas iguales	24,537	0,000	79,914	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	79,914	9,70	0,000
Fluoreno	Se asumen varianzas iguales	29,523	0,000	8,322	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	8,322	10,09	0,000
Fenantreno	Se asumen varianzas iguales	17,478	0,001	3,363	18	0,003
	No se asumen varianzas iguales	----	----	3,363	10,86	0,006
Pireno	Se asumen varianzas iguales	27,815	0,000	11,088	18	0,000
	No se asumen varianzas iguales	----	----	11,088	10,30	0,000

6.2.3 Procedimiento de limpieza

Seleccionada la extracción ultrasónica con la mezcla de solvente Acetona/Diclorometano en relación 1:1, se probó un procedimiento de limpieza del extracto antes de ser inyectado al cromatógrafo de gases. Los recuperados generados (tabla 28) fueron analizados estadísticamente con la prueba de distribución t de student..

Tabla 28. Porcentajes de recuperación ensayo del procedimiento de limpieza

Método de Extracción	Naftaleno	Acenaftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
Extracción con Acetona/Diclorometano 1:1 sin procedimiento de limpieza	106	114	116	118	119
	107	116	116	119	119
	107	115	116	119	119
	107	115	116	118	119
	109	118	119	122	122
	108	116	117	120	120
	109	119	120	122	123
	107	115	116	119	119
	110	118	119	122	122
	111	120	121	124	124
Extracción con Acetona/Diclorometano 1:1 aplicando procedimiento de limpieza	109	117	117	120	121
	109	116	116	120	120
	109	117	115	120	119
	109	116	117	121	121
	107	117	115	122	119
	109	116	119	121	121
	108	117	115	120	120
	109	116	118	121	119
	109	116	115	121	120
	109	117	115	121	119

De acuerdo a la tabla 29, para todos los compuestos en la prueba de Levene, se asumen varianzas iguales ($p > 0,05$) y podemos comprobar la aceptación de la hipótesis nula de que en la población las medias de ambos grupos son iguales, pues la probabilidad en todos los casos (sig bilateral), es superior al 0,05.

El estadístico t de student, es mayor a 0,05, aceptando la H_0 : No existe diferencia significativa en los datos de las medias de las poblaciones probadas. Por tal motivo los %R generados aplicando el procedimiento de limpieza no difieren significativamente y es apropiado la utilización de dicho proceso ya que no afecta los recuperados del procedimiento evaluado.

Tabla 29. Estadístico de Levene para el ensayo del procedimiento de limpieza

Compuesto	Ho	Prueba de Levene de calidad de varianzas		Prueba t para igualdad de medias		
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)
Naftaleno	Se asumen varianzas iguales	8,733	0,051	1,095	18	0,288
	No se asumen varianzas iguales	----	----	1,095	12,123	0,295
Acenaftaleno	Se asumen varianzas iguales	19,653	0,062	0,152	18	0,881
	No se asumen varianzas iguales	----	----	0,152	10,230	0,882
Fluoreno	Se asumen varianzas iguales	2,294	0,147	1,807	18	0,087
	No se asumen varianzas iguales	----	----	1,807	16,742	0,089
Fenantreno	Se asumen varianzas iguales	16,024	0,051	0,584	18	0,566
	No se asumen varianzas iguales	----	----	0,581	10,915	0,571
Pireno	Se asumen varianzas iguales	13,778	0,052	1,033	18	0,315
	No se asumen varianzas iguales	----	----	1,033	12,471	0,321

6.2.4 Efecto matriz

Se evaluó el efecto matriz del suelo y las pendientes de las curvas generadas fueron analizadas con el estadístico de distribución t de student para evaluar su significancia.

De acuerdo a la tabla 30, para todos los compuestos en la prueba de Levene, se asumen varianzas iguales ($p > 0,05$) y podemos comprobar la aceptación de la hipótesis nula de que en la población las medias de ambos grupos son iguales, pues la probabilidad en todos los casos (sig bilateral), es superior al 0,5.

El estadístico t de student, es mayor a 0,05, aceptando la Ho: No existe diferencia significativa en los datos de las medias de las poblaciones probadas. Por tal motivo las pendientes de las curvas en solvente, como, en el extracto del suelo, no difieren significativamente y por ende no se generó efecto matriz en las muestras reales del presente ensayo.

Tabla 30. Prueba de distribución t de student para la evaluación del efecto matriz en el suelo.

Compuesto	Ho	Prueba de Levene de calidad de varianzas		Prueba t para igualdad de medias		
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)
Naftaleno	Se asumen varianzas iguales	1,487	0,290	0,253	4	0,813
	No se asumen varianzas iguales	----	----	0,253	3,145	0,816
Acenaftaleno	Se asumen varianzas iguales	1,686	0,264	0,796	4	0,471
	No se asumen varianzas iguales	----	----	0,796	2,810	0,488
Fluoreno	Se asumen varianzas iguales	14,003	0,051	2,626	4	0,058
	No se asumen varianzas iguales	----	----	2,626	2,015	0,119
Fenantreno	Se asumen varianzas iguales	11,919	0,056	0,866	4	0,436
	No se asumen varianzas iguales	----	----	0,866	2,067	0,475
Pireno	Se asumen varianzas iguales	0,149	0,719	0,570	4	0,599
	No se asumen varianzas iguales	----	----	0,570	3,631	0,602

6.3 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HAP's EN SUELOS DE CORTES DE PERFORACIÓN.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la validación de la determinación de Naftaleno, Acenaftaleno, Fenantreno, Fluoreno y Pireno en suelos por CG/FID. Se evaluaron los parámetros de linealidad, exactitud, precisión y límites críticos. Se empleó el software estadístico SPSS, versión 22 para los respectivos análisis.

Se evaluaron 5 niveles de concentración durante 7 días diferentes. Se preparó una curva de calibración para cada día y conjuntamente se preparó y se cuantificó en el CG/FID el lote de muestras de la validación descrito en el ítem 5.2.11.

Linealidad

Correspondiente a la linealidad instrumental, se evaluaron curvas de calibración de los HAP's en diclorometano, para la cuantificación del lote de muestras.

Precisión y Exactitud

Se determinó la precisión y exactitud del método obteniendo los %R y los %C.V. de las curvas de calibración para el análisis de precisión intermedia, los resultados

obtenidos se presentan en la tabla 31. Los % C.V son inferiores al 20 % y los % R son adecuados (70-130%).

Tabla 31. Exactitud y precisión del método

Nivel	Precisión Intermedia	Naftaleno	Acenaftaleno	Fenantreno	Fluoreno	Pireno
N1	Desv. Est.	0,052	0,076	0,066	0,031	0,131
	%CV	2,42	3,67	3,13	1,40	6,08
	%R	107	104	106	109	107
N2	Desv. Est.	0,201	0,310	0,161	0,100	0,199
	%CV	3,84	6,05	3,07	1,86	3,84
	%R	105	102	105	107	103
N3	Desv. Est.	0,507	0,153	0,371	0,135	0,163
	%CV	5,09	1,58	3,65	1,30	1,59
	%R	100	97	102	103	102
N4	Desv. Est.	0,824	0,366	0,620	0,227	0,140
	%CV	4,21	1,82	3,21	1,20	0,723
	%R	98	100	97	94,5	96,6
N5	Desv. Est.	0,155	0,096	0,116	0,045	0,030
	%CV	0,221	0,137	0,165	0,065	0,043
	%R	100	100	100	100	100

Con el fin de determinar la exactitud y precisión para la metodología global se aplicó la prueba de Levene, donde la significancia estadística p basándose en la media es superior a 0.05 para cada HAP's, los resultados se observan en la tabla 32, por lo que la prueba estadística es no significativa y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, concluyendo que el nivel de concentración no afecta la variabilidad en los % R obtenidos para cada una de las curvas de calibración (Anexo C).

Tabla 32. Prueba de Levene (homogeneidad de varianzas) para los %R

Compuesto	Estadístico de Levene	Sig.
Naftaleno	6,378	0,001
Acenaftaleno	39,437	0,000
Fenantreno	9,007	0,000
Fluoreno	6,480	0,001
Pireno	13,668	0,000

También se aplican pruebas de normalidad para el área del pico cromatográfico de cada nivel en la curva de calibración en función de la concentración (Anexo A, tabla 1.) y a los porcentajes de recuperación en función de la concentración (Anexo A, tabla 3) obteniendo un $p > 0,05$ en todos los HAP's, indicando que los datos provienen de una población normal y podemos aplicar pruebas paramétricas como ANOVA. Con los resultados de la prueba de ANOVA que se aprecian en la tabla 33 se confirma que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación con un $p > 0,05$ permitiendo aceptar y confirmar la hipótesis nula de la prueba de Levene.

Tabla 33. ANOVA para los porcentajes de recuperación

HAP's	Parámetro	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Naftaleno	Inter-grupos	42,950	6	7,158	0,255	0,953
	Intra-grupos	787,062	28	28,109		
	Total	830,011	34			
Acenaftaleno	Inter-grupos	58,826	6	9,804	0,555	0,762
	Intra-grupos	494,609	28	17,665		
	Total	553,436	34			
Fenantreno	Inter-grupos	22,039	6	3,673	0,163	0,984
	Intra-grupos	629,893	28	22,496		
	Total	651,932	34			
Fluoreno	Inter-grupos	5,839	6	0,973	0,027	1,000
	Intra-grupos	992,724	28	35,454		
	Total	998,563	34			
Pireno	Inter-grupos	20,497	6	3,416	0,119	0,993
	Intra-grupos	800,763	28	28,599		
	Total	821,260	34			

Con los resultados estadísticos obtenidos en la prueba de Levene y ANOVA, podemos calcular un % R_{prom} y un % C.V_{typ} para la metodología global en cada compuesto, se observa que acenaftaleno aportó el %CV_{typ} más bajo (4%). Adicional se calcularon los intervalos de confianza para el % R_{prom} en la metodología global de cada compuesto. Los resultados se muestran en la tabla 34.

Tabla 34. Porcentajes de recuperación globales e intervalos de confianza

Compuesto	%R _{prom}	95% de Intervalo de Confianza		%CV _{typ}
		Inferior	Superior	
Naftaleno	101,8875	100,1902	103,5847	4,85
Acenaftaleno	100,7928	99,4068	102,1787	4,00
Fenantreno	101,838	100,3338	103,3422	4,30
Fluoreno	102,8754	101,0138	104,7370	5,27
Pireno	101,9705	100,2822	103,6588	4,82

6.3.1 Lote de muestras utilizadas en la Validación del método para suelos de cortes de perforación.

Para el análisis de las muestras de suelo de cortes de perforación se realizó el análisis por triplicado durante cinco días diferentes, se preparó una curva de calibración por día y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente. Se realizó la corrección en la concentración obtenida para cada muestra teniendo en cuenta el %R promedio del método. Se determinó la precisión en términos del % C.V para cada una de las muestras.

Se utilizaron muestras de suelos de corte de perforación provenientes de empresas petroleras a las cuales se les aplicó la metodología 3550C de la EPA SW-846, obteniendo de allí el extracto orgánico cuantificado por cromatografía de gases con un detector de ionización por llama (CG/FID), metodología EPA 8100. Se aplica el método

de validación estipulado en el laboratorio ChemiLab S.A.S para muestras sólidas bajo los niveles de concentración siguientes: Muestra real rango bajo (MRB), muestra real rango medio (MRM) y muestra real rango alto (MRA).

Se analizaron tres réplicas de dichas muestras durante cinco días diferentes, preparando una curva de calibración por día y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente. Se realizó la corrección en la concentración del HAP's obtenido para cada muestra, teniendo en cuenta el % R promedio del método, se determinó la precisión en términos del % C.V para cada una de las tres muestras, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 35. Adicional a esto se observan los %CV de las muestras del lote de validación con valores menores al 20%, el cual es aceptado por la metodología 8000 de la EPA.

Tabla 35. Resultados de análisis del lote de muestras de la validación.

Muestra de Validación	Compuesto	Promedio	Desviación estándar	Varianza	%CV
MRB	Naftaleno	14,5	1,61	2,59	11,1
	Acenaftaleno	26,5	1,50	2,25	5,66
	Fluoreno	27,1	3,47	12,1	12,8
	Fenantreno	26,6	3,51	12,3	13,2
	Pireno	27,8	3,72	13,8	13,4
MRM	Naftaleno	22,7	2,32	5,39	10,2
	Acenaftaleno	28,4	2,81	7,91	9,9
	Fluoreno	29,8	3,44	11,9	11,6
	Fenantreno	35,0	4,23	17,9	12,1
	Pireno	36,5	4,25	18,1	11,7
MRA	Naftaleno	24,1	2,19	4,81	9,1
	Acenaftaleno	37,9	4,33	18,7	11,4
	Fluoreno	48,5	5,05	25,5	10,4
	Fenantreno	49,9	5,14	26,4	10,3
	Pireno	55,1	6,35	40,3	11,5

6.3.2 Estimación de la incertidumbre en la determinación de HAP's en suelos de cortes de perforación mediante la metodología de fuentes globales

Se determinó la incertidumbre de las metodologías validadas con muestras sólidas. Inicialmente se muestra la contribución de las fuentes aleatorias encontrándose un valor promedio, una desviación estándar y una desviación estándar relativa de cada grupo de datos con los cuales se calcula la desviación estándar relativa del total de los datos (RSDt). También se determina la contribución de las fuentes sistemáticas en la incertidumbre del método con los porcentajes de recuperación de la concentración de estos dos patrones, donde se hace necesario calcular el promedio de los recuperados, su desviación estándar para poder calcular la incertidumbre en la recuperación promedio (URp). Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95% para (n-1) grados de libertad, es decir; para ver si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y estableciendo como Ho "el factor de recobro es significativamente diferente de 1", para esto se calcula el t_{expl} y

se compara con el t_{critl} , siendo que si $t_{expl} > t_{critl}$ se rechaza la H_0 y si el $t_{expl} < t_{critl}$ se acepta la H_0 .

En la tabla 36 se muestran los resultados en los cuales se observa que para estos HAP's, el t experimental es mayor que el t crítico en los patrones, por lo tanto se utiliza la fórmula de incertidumbre factor de recobro corregida para calcular la incertidumbre combinada total, con la que se calcula la incertidumbre expandida del método como se muestra en las tablas, aceptando la hipótesis nula.

Tabla 36. Incertidumbres del método para suelos de cortes de perforación

Fuentes	Naftaleno	Acenaftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
Precisión (fuentes aleatorias) RSDt	0,017	0,026	0,010	0,022	0,043
Sesgo (fuentes sistemáticas) Incertidumbre en la recuperación promedio $U(Rp)$	0,011	0,009	0,013	0,010	0,016
t exp (valor absoluto)	3,39	2,29	3,79	3,07	2,47
t crítico (valor absoluto)	2,16	2,16	2,16	2,16	2,16
Incertidumbre factor de recobro corregida ($Uc(Rp)_{corr}$)	0,021	0,014	0,027	0,018	0,025
Incertidumbre Combinada total (U_{total})	0,027	0,029	0,028	0,028	0,049
Incertidumbre expandida del método ($U_{exp. Met}$): \pm	0,054	0,058	0,055	0,057	0,098

Con los cálculos de las incertidumbres se obtiene la gráfica de la figura 16 representadas en forma de barras, donde observamos que la principal fuente de incertidumbre en la medida del análisis de las muestras, es por fuentes aleatorias que no se pueden controlar y afectan la medición en la determinación de HAP's por CG/FID, mientras que las fuentes sistemáticas que pueden ser las del equipo o las del operario no presentan un efecto mayor en la medida.

Figura 16. Cuantificación de las fuentes de incertidumbre de los HAP's

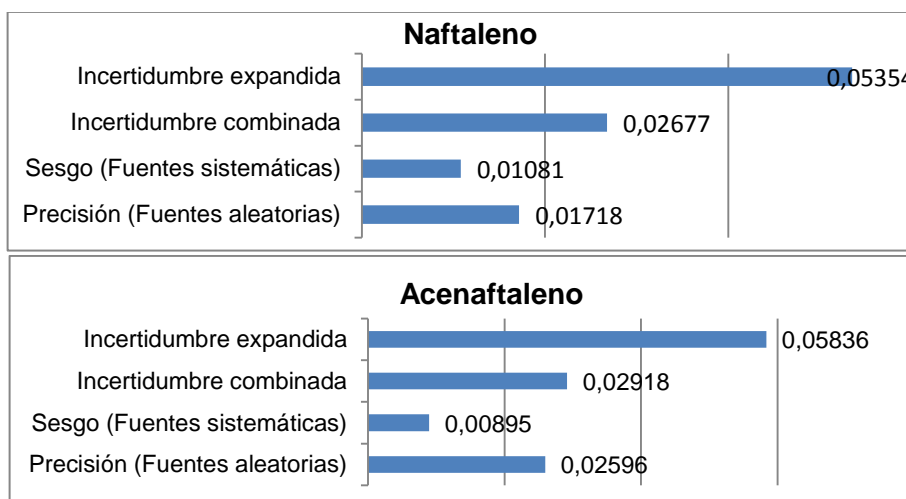
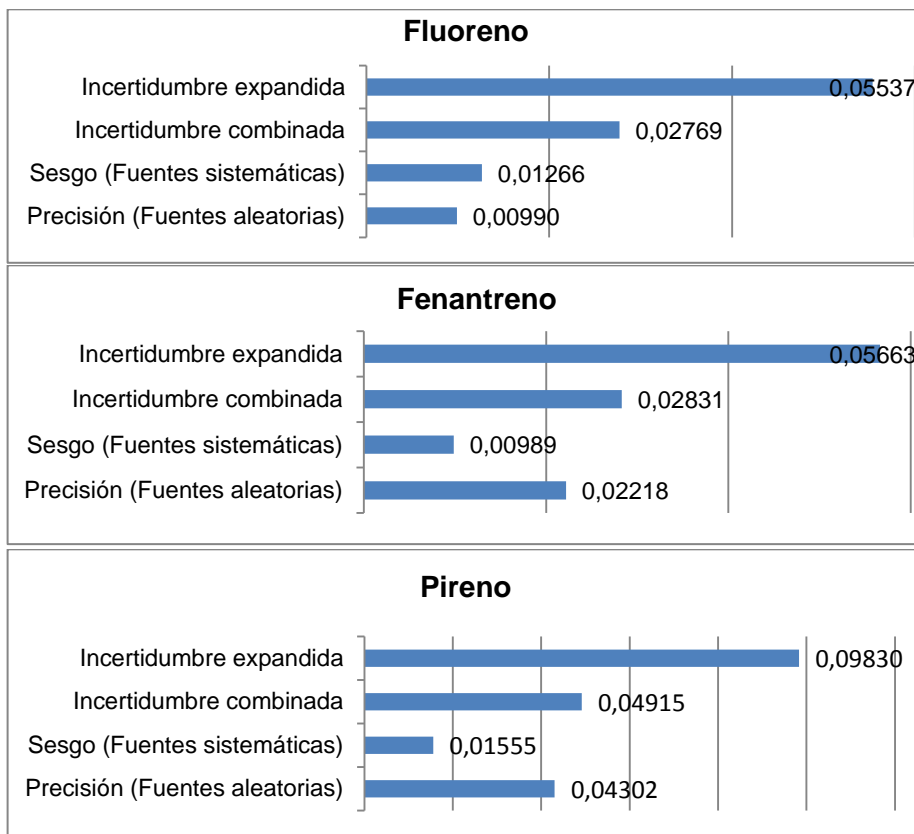


Figura 16. (Continuación)



6.3.3 Robustez

Ya que la robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal se consideró importante la evaluación de la misma, para evaluarla se procedió de la siguiente forma:

Se seleccionaron algunos parámetros de la metodología tanto en la extracción, como en la cuantificación. Este estudio se realizó con n variables en $n+1$ ensayos. Se aplicó el diseño experimental de Plackett y Burman. Dichas variables se muestran en la tabla 37.

Tabla 37. Variables en el estudio de robustez en la determinación de HAP's en suelos.

VARIABLE	VALOR DE VALIDACIÓN	VALOR ALTERADO	VARIABILIDAD
Peso de Suelo Seco	A = 10g Suelo	a = 5g	$V_A = 1/4 (s+t+u+v) - 1/4 (w+x+y+z)$
Extracciones sucesivas	B = 3*100mL	b = 2*100mL	$V_B = 1/4 (s+t+w+x) - 1/4 (u+v+y+z)$
Sulfato de sodio anhidro	C = 10g Na ₂ SO ₄	c = 5g Na ₂ SO ₄	$V_C = 1/4 (s+u+w+y) - 1/4 (t+v+x+z)$
Volumen final de concentración	D = 2mL	d = 1 mL	$V_D = 1/4 (s+t+y+z) - 1/4 (u+v+w+x)$
Tiempo extracción ultrasónica	E = 4 min	e =3 min	$V_E = 1/4 (s+u+x+z) - 1/4 (t+v+w+y)$
Tipo de Filtrado	F=Filtrado a Gravedad	f = Filtrado al Vacío	$V_F = 1/4 (s+v+w+z) - 1/4 (t+u+x+y)$
Vacío Rotaevaporador	G = sin vacío	g = Con vacío	$V_G = 1/4 (s+v+x+y) - 1/4 (t+u+w+z)$

La matriz que se empleó para realizar el estudio de robustez mediante el diseño experimental de Plackett y Burman se muestra a continuación (tabla 38). Para cada factor se calculó el efecto que supone utilizar el valor indicado en el método y el alternativo.

Tabla 38. Diseño Experimental de Plackett y Burman para evaluar Robustez en la determinación de HAP's en suelos.

	EXPERIMENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
FACTORES	A	A	A	A	a	a	a	a
	10g Suelo	10g Suelo	10g Suelo	10g Suelo	5g Suelo	5g Suelo	5g Suelo	5g Suelo
	B	B	b	b	B	B	b	b
	3*100mL	3*100mL	2*100mL	2*100mL	3*100mL	3*100mL	2*100mL	2*100mL
	C	c	C	c	C	c	C	c
	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄	10g Na ₂ SO ₄	5g Na ₂ SO ₄
	D	D	d	d	d	d	D	D
	2mL	2mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	2mL	2mL
	E	e	E	e	e	E	e	E
	4 min	3 min	4 min	3 min	3 min	4 min	3 min	4 min
F	f	f	F	F	f	f	F	
Filtrado a Gravedad	Filtrado al Vacío	Filtrado al Vacío	Filtrado a Gravedad	Filtrado a Gravedad	Filtrado al Vacío	Filtrado al Vacío	Filtrado a Gravedad	
G	g	g	G	g	G	G	g	
sin vacío	Con vacío	Con vacío	sin vacío	Con vacío	sin vacío	sin vacío	Con vacío	
RESULTADO	s	t	u	v	w	x	y	z

Dicho efecto se calculó como la media de los resultados de recuperación obtenidos en los experimentos de repetibilidad. Las diferencias mayores indican que los factores correspondientes tienen mayor influencia que el resto sobre la precisión del método.

Estadísticamente para decidir si la influencia de un factor es relevante se compara el valor del efecto con la expresión $s\sqrt{2}$, donde s es la desviación estándar obtenida en el ensayo de repetibilidad del método. Ya que las desviaciones no se pueden promediar, se realiza el cálculo de la misma a partir de la varianza promedio. Las diferencias superiores en valor absoluto al resultado de esta expresión se consideran significativas, los resultados se muestran en las tablas 39 y 40.

Tabla 39. Recuperados Obtenidos en la Evaluación de la Robustez en la Determinación de HAP's en suelos

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Resultado	s	T	u	v	W	x	y	z	s
Naftaleno (%R)	80,9	63,8	84,7	83,4	19,3	75,6	34,9	37,7	80,9
Acenaftaleno (%R)	81,2	67,1	130	110	57,5	77,6	33,9	38,2	81,2
Fluoreno (%R)	77,5	63,6	131	110	63,0	75,3	30,9	38,5	77,5
Fenantreno (%R)	82,1	67,9	140	117	71,0	80,6	33,0	41,8	82,1
Pireno (%R)	83,5	69,8	142	118	73,0	82,5	34,5	42,8	83,5

Tabla 40. Efecto de cada factor sobre el recuperado en la determinación de HAP's en suelos

Variabilidad	V _A	V _B	V _C	V _D	V _E	V _F	V _G	$s\sqrt{2}$
Naftaleno	36,3	0,265	10,1	11,4	19,4	9,44	17,3	6,03
Acenaftaleno	45,1	7,00	2,41	38,5	14,6	5,46	2,45	33,8
Fluoreno	43,6	7,71	3,70	42,2	13,7	2,89	0,532	23,3
Fenantreno	45,1	7,53	4,62	45,9	13,8	2,32	1,90	26,7
Pireno	45,1	7,08	5,12	46,1	14,0	3,05	2,42	34,0

De la tabla 39 y 40 se puede apreciar que uno de los factores determinantes en la determinación de HAP's en suelos es el volumen final de concentración del extracto. Este factor debe ser controlado ya que tiene un efecto determinante en la precisión del método. Además se puede observar que el vacío en el momento de la filtración y la concentración del extracto en el rotaevaporador bajan los porcentajes de recuperación de los analitos sobre todo en el naftaleno, al cual todas las alteraciones del método lo afectan.

Pese a que las variables mencionadas anteriormente presentan mayor influencia en la precisión del método, los resultados de la tabla indican que la mayoría de las variables seleccionadas no son determinantes y que el método es robusto a dichas variaciones, exceptuando al naftaleno. Por lo anterior y tomando en cuenta los %R, se decide mantener controladas las variables del ensayo.

7. CONCLUSIONES

1. Se implementó la metodología 3550C/8100 de la EPA US para la determinación de naftaleno, acenaftaleno, fluoreno, fenantreno y pireno en suelos de cortes de perforación petrolera, aplicable a otras matrices ambientales, por la técnica de cromatografía de gases, bajo la, EPA SW-846 y la ISO/IEC 17025
2. Se implementaron procesos de extracción ultrasónica según el método 3550C de la EPA en los suelos para determinar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en suelos, mediante cuantificación por cromatografía gaseosa implementada debidamente para cada compuesto.
3. Los límites de detección y de cuantificación son adecuados para cada curva de calibración en cada HAP's, están sobre el primer nivel y permiten tener una cuantificación sensible a bajas concentraciones del compuesto.
4. Los resultados de las muestras están dentro de los intervalos del porcentaje de recuperación del método global, afirmando que la técnica es adecuada para la determinación de HAP's para este tipo de matrices (suelos) con %C.V. entre los rangos permitidos por la metodología 8000 de la EPA (<20%)
5. La incertidumbre para el análisis de las muestras se calcula con un t experimental mayor al t crítico obtenido de los resultados estadísticos aplicados para todos los HAP's validados, calculando la incertidumbre expandida a partir de la incertidumbre total combinada, pero aplicando un factor de recobro, observando que la incertidumbre del método proviene con mayor proporción de las fuentes aleatorias que de las fuentes sistemáticas.
6. Los datos obtenidos en la validación provienen de una población de datos normales permitiendo aplicar pruebas estadísticas paramétricas como ANOVA, para determinar las diferencias significativas en los resultados obtenidos en base a repetitividad y precisión intermedia del método.
7. Se concluye que el método 3550C/8100 para la determinación de HAP's en suelos de cortes de perforación queda debidamente implementado en el laboratorio Chemilab S.A.S, siendo un método robusto, sensible, preciso, exacto, lineal y reproducible.
8. Se modificó el Procedimiento de muestreo para suelos, teniendo como referencia, Los procedimientos de muestreo para suelos y aguas aplicados por el laboratorio Chemilab S.A.S. y la Norma Técnica Colombiana NTC 17025, realizando cadenas de vigilancia y custodia para los suelos.

9. Se estableció el procedimiento de ensayo, aplicando el método 3550C/8100 de la Norma EPA SW-846, para la extracción y cuantificación de los HAP's
10. Se elaboraron los respectivos formatos de captura de datos, protocolos de ensayo e instructivos técnicos en suelos, necesarios para llevar a cabo de manera clara la determinación de HAP's en suelos.
11. Con la actual validación el laboratorio ChemiLab S.A.S, solicitará extensión de alcance en su actual acreditación para análisis cromatográficos ante el ente acreditador, el IDEAM.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Decreto 4741 30 de Diciembre 2005. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial República de Colombia.
2. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. República de Colombia 2005
3. CASTILLO A., Beatriz, GONZÁLEZ H., Rolando. Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la cuantificación de Fármacos. Revista Cubana de Farmacología.
4. UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Validation of Compendial Methods. USP Capítulo. [en línea]:
5. Z.L. He, X.E. Yanga, P.J. Stoffellab, Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, Rev. J. Trace Elem. Med. Biol. 19 (2005) 125 140.
6. Miller, J., Miller, J. ESTADÍSTICA Y QUIMIOMETRÍA Para Química Analítica. 4ª Edición. Editorial Prentice Hall. España. 2000. 278p
7. SKOOG, D. Principios De Análisis Instrumental. 5ª Edición. Editorial Mcgraw Hill. España. 2001.
8. IDEAM. Programa de Físico-química Ambiental. Protocolo estandarización de métodos analíticos. Bogotá, 1999. 10 p.
9. Silfredo J. Sáez Ruiz. Luis Font Avila. INCERTIDUMBRE EN LA MEDICION TÉORIA Y PRÁCTICA. Maracay Estado de Aragua. Febrero del 2001
10. GTC 51: Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones.
11. QUATTROCCHI, Oscar. Introducción a la HPLC. Editorial Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires. 1989.
12. W. Rice, Eugene. B. Baird, Rodger. D. Eaton, Andrew. S. Clesceri, Lenore (2012) STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, Edición 22. Estados Unidos de América: Cenvo Publisher Services.
13. Ministerio de Energía y Minas. PERFORACIÓN. República del Perú. 1998
14. Jaramillo, M. RESEÑA TOXICOLÓGICA DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, Revista de salud pública sobre sustancias peligrosas y sus efectos sobre la salud, España, 1993.

15. J.A.Glaser, D.L.Foerst, G.D.McKee, S.A.Quave, W.L.Budde, TRACE ANALYSES FOR WASTE WATERS, ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY (15, nº 12), p.1426, 1981
16. Orozco, C., CONTAMINACIÓN AMBIENTAL UNA VISIÓN DESDE LA QUÍMICA. 2003, España: Thomson.
17. GARAVITO, José. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS PRESENTES EN EL MATERIAL PARTICULADO EMITIDO POR FUENTES MOVILES EN LA LOCALIDAD DE PUENTE ARANDA DE LA CIUDAD DE BOGOTA. Universidad de la Salle. 2006. Bogotá.
18. MARENGO, José. EVALUACIÓN DE PLANTAS CON POTENCIAL FITORREMIADOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DE LA CIÉNAGA LAS CUCHARILLAS. San Juan, Puerto Rico. 2008
19. WILEY, Jhon. SAMPLE PREPARATION TECHNIQUES IN ANALYTICAL CHEMISTRY. Editado por Somenath Mitra. Jhon Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 2003
20. MOSQUERA, Diego. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y ORGANOFOSFORADOS EN SUELOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTORES FID Y ECD. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Risaralda. 2012.
21. GONZALES SAAVEDRA Leslie Stephanie and MENESES VENEGAS Cesar Mauricio, Determinación de la característica de Toxicidad del Ingrediente activo "Clorpirifos" en el plaguicida organofosforado ATTAMIX SB mediante el procedimiento de TCLP, Ingeniero Ambiental y Sanitario, Bogotá D.C Universidad de La Salle 2008 p. 252
22. UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Validation of Compendial Methods. USP Capítulo. [en línea]:
23. US Environmental Protection Agency. Method 8100 – POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS, September 1986.
24. US Environmental Protection Agency. Method 8000 – DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS, March 2003.
25. US Environmental Protection Agency. Method 3500 – ORGANIC EXTRACTION AND SAMPLE PREPARATION, February 2007
26. BUENO, Gersón. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE COCAÍNA, OPIACEOS Y SUS PRINCIPALES ADULTERANTES POR

CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS), EN EL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira 2012.

27. US Environmental Protection Agency. Method 3550C – ULTRASONIC EXTRACTION, February 2007.
28. US Environmental Protection Agency. Method 3600 –CLEANUP, December 1996

ANEXOS

ANEXO A

Tabla 1. Pruebas de normalidad aplicadas al área en función de la concentración.

HAP's	Concentración (mg/L)	Estadístico Shapiro-Wilk	gl	Sig.
Naftaleno	2	0,864	7	0,165
	5	0,940	7	0,635
	10	0,833	7	0,085
	20	0,930	7	0,555
	70	0,872	7	0,195
Acenaftaleno	2	0,864	7	0,164
	5	0,871	7	0,189
	10	0,906	7	0,369
	20	0,849	7	0,121
	70	0,874	7	0,202
Fenantreno	2	0,850	7	0,123
	5	0,897	7	0,314
	10	0,924	7	0,503
	20	0,916	7	0,439
	70	0,863	7	0,159
Fluoreno	2	0,852	7	0,127
	5	0,904	7	0,359
	10	0,939	7	0,634
	20	0,964	7	0,856
	70	0,939	7	0,630
Pireno	2	0,647	7	0,061
	5	0,853	7	0,132
	10	0,935	7	0,592
	20	0,829	7	0,079
	70	0,949	7	0,716

Tabla 2. Pruebas de normalidad de valores del área en función del día.

Hidrocarburo Aromático Policíclico	Días de validación	Estadístico Shapiro-Wilk	gl	Sig.
Naftaleno	1	0,842	5	0,171
	2	0,842	5	0,171
	3	0,842	5	0,171
	4	0,842	5	0,171
	5	0,754	5	0,053
	6	0,771	5	0,056
	7	0,754	5	0,053
Acenaftaleno	1	0,914	5	0,492
	2	0,859	5	0,223
	3	0,859	5	0,223
	4	0,859	5	0,223
	5	0,914	5	0,492
	6	0,914	5	0,492
	7	0,914	5	0,492

Anexo A, Tabla 2. (Continuación)

Hidrocarburo Aromático Policíclico	Días de validación	Estadístico Shapiro-Wilk	gl	Sig.
Fenantreno	1	0,881	5	0,314
	2	0,881	5	0,314
	3	0,881	5	0,314
	4	0,881	5	0,314
	5	0,881	5	0,314
	6	0,881	5	0,314
	7	0,881	5	0,314
Fluoreno	1	0,914	5	0,492
	2	0,859	5	0,223
	3	0,859	5	0,223
	4	0,859	5	0,223
	5	0,859	5	0,223
	6	0,859	5	0,223
	7	0,859	5	0,223
Pireno	1	0,859	5	0,223
	2	0,859	5	0,223
	3	0,859	5	0,223
	4	0,859	5	0,223
	5	0,859	5	0,223
	6	0,859	5	0,223
	7	0,914	5	0,492

Tabla 3. Pruebas de normalidad para los %R de los niveles de concentración en las curvas de calibración

Hidrocarburo Aromático Policíclico	Niveles de Concentración	Estadístico Shapiro-Wilk	gl	Sig.
Naftaleno	2,00	0,154	7	0,200*
	5,00	0,260	7	0,167
	10,00	0,248	7	0,200*
	20,00	0,189	7	0,200*
	70,00	0,164	7	0,200*
	2,00	0,154	7	0,200*
	5,00	0,260	7	0,167
Acenaftaleno	2,00	0,217	7	0,200*
	5,00	0,325	7	0,024
	10,00	0,167	7	0,200*
	20,00	0,268	7	0,138
	70,00	0,307	7	0,045
	2,00	0,275	7	0,117
	5,00	0,271	7	0,130
Fenantreno	2,00	0,283	7	0,095
	5,00	0,316	7	0,034
	10,00	0,288	7	0,082
	20,00	0,217	7	0,200*
	70,00	0,325	7	0,024
	2,00	0,167	7	0,200*
	5,00	0,268	7	0,138

Anexo A, Tabla 3. (Continuación)

Hidrocarburo Aromático Policíclico	Niveles de Concentración	Estadístico Shapiro-Wilk	gl	Sig.
Fluoreno	2,00	0,219	7	0,200*
	5,00	0,235	7	0,200*
	10,00	0,163	7	0,200*
	20,00	0,231	7	0,200*
	70,00	0,236	7	0,200*
	2,00	0,211	7	0,200*
	5,00	0,244	7	0,200*
Pireno	2,00	0,335	7	0,017
	5,00	0,192	7	0,200*
	10,00	0,271	7	0,130
	20,00	0,219	7	0,200*
	70,00	0,235	7	0,200*
	2,00	0,163	7	0,200*
	5,00	0,231	7	0,200*

ANEXO B**Anexo B. Prueba de Bonferroni (post hoc) del área en función del nivel de concentración del método de determinación de HAP's en suelos**

Compuesto	(I) NIVEL	(J) NIVEL	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Fluoreno	1	2	-5,5469714	,2790640	0,000	-6,392479	-4,701464
		3	-14,2635143	,2790640	0,000	-15,109022	-13,418007
		4	-29,2752429	,2790640	0,000	-30,120751	-28,429735
		5	-119,2030571	,2790640	0,000	-120,048565	-118,357549
	2	1	5,5469714	,2790640	0,000	4,701464	6,392479
		3	-8,7165429	,2790640	0,000	-9,562051	-7,871035
		4	-23,7282714	,2790640	0,000	-24,573779	-22,882764
	3	5	-113,6560857	,2790640	0,000	-114,501593	-112,810578
		1	14,2635143 [*]	,2790640	0,000	13,418007	15,109022
		2	8,7165429 [*]	,2790640	0,000	7,871035	9,562051
		4	-15,0117286 [*]	,2790640	0,000	-15,857236	-14,166221
		5	-104,9395429 [*]	,2790640	0,000	-105,785051	-104,094035
4	1	29,2752429 [*]	,2790640	0,000	28,429735	30,120751	
	2	23,7282714 [*]	,2790640	0,000	22,882764	24,573779	
	3	15,0117286 [*]	,2790640	0,000	14,166221	15,857236	
	5	-89,9278143 [*]	,2790640	0,000	-90,773322	-89,082307	

Anexo B. (Continuación)

Compuesto	(I) NIVEL	(J) NIVEL	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
Fluoreno	5	1	119,2030571 [*]	,2790640	0,000	118,357549	120,048565	
		2	113,6560857 [*]	,2790640	0,000	112,810578	114,501593	
		3	104,9395429 [*]	,2790640	0,000	104,094035	105,785051	
		4	89,9278143 [*]	,2790640	0,000	89,082307	90,773322	
Pireno	1	2	-5,9956143 [*]	,4598803	0,000	-7,388959	-4,602270	
		3	-15,8431000 [*]	,4598803	0,000	-17,236445	-14,449755	
		4	-33,5298429 [*]	,4598803	0,000	-34,923187	-32,136498	
		5	-132,7642000 [*]	,4598803	0,000	-134,157545	-131,370855	
		2	1	5,9956143 [*]	,4598803	0,000	4,602270	7,388959
Pireno	2	3	-9,8474857 [*]	,4598803	0,000	-11,240830	-8,454141	
		4	-27,5342286 [*]	,4598803	0,000	-28,927573	-26,140884	
		5	-126,7685857 [*]	,4598803	0,000	-128,161930	-125,375241	
		3	1	15,8431000 [*]	,4598803	0,000	14,449755	17,236445
		Pireno	3	2	9,8474857 [*]	,4598803	0,000	8,454141
4	-17,6867429 [*]			,4598803	0,000	-19,080087	-16,293398	
5	-116,9211000 [*]			,4598803	0,000	-118,314445	-115,527755	
Pireno	4	1	33,5298429 [*]	,4598803	0,000	32,136498	34,923187	
		2	27,5342286 [*]	,4598803	0,000	26,140884	28,927573	
		3	17,6867429 [*]	,4598803	0,000	16,293398	19,080087	
		5	-99,2343571 [*]	,4598803	0,000	-100,627702	-97,841013	
		Pireno	5	1	132,7642000 [*]	,4598803	0,000	131,370855
2	126,7685857 [*]			,4598803	0,000	125,375241	128,161930	
3	116,9211000 [*]			,4598803	0,000	115,527755	118,314445	
4	99,2343571 [*]			,4598803	0,000	97,841013	100,627702	
Naftaleno	1	2	-4,4360000 [*]	1,2516345	0,013	-8,228200	-,643800	
		3	-11,1907286 [*]	1,2516345	0,000	-14,982929	-7,398529	
		4	-24,8181857 [*]	1,2516345	0,000	-28,610386	-21,025986	
		5	-97,1463286 [*]	1,2516345	0,000	-100,938529	-93,354129	
		2	1	4,4360000 [*]	1,2516345	0,013	,643800	8,228200
	Naftaleno	2	3	-6,7547286 [*]	1,2516345	0,000	-10,546929	-2,962529
			4	-20,3821857 [*]	1,2516345	0,000	-24,174386	-16,589986
			5	-92,7103286 [*]	1,2516345	0,000	-96,502529	-88,918129

Anexo B. (Continuación)

Compuesto	(I) NIVEL	(J) NIVEL	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
Naftaleno	3	1	11,1907286 [*]	1,2516345	0,000	7,398529	14,982929	
		2	6,7547286 [*]	1,2516345	0,000	2,962529	10,546929	
		4	-13,6274571 [*]	1,2516345	0,000	-17,419657	-9,835257	
		5	-85,9556000 [*]	1,2516345	0,000	-89,747800	-82,163400	
	4	1	24,8181857 [*]	1,2516345	0,000	21,025986	28,610386	
		2	20,3821857 [*]	1,2516345	0,000	16,589986	24,174386	
		3	13,6274571 [*]	1,2516345	0,000	9,835257	17,419657	
		5	-72,3281429 [*]	1,2516345	0,000	-76,120343	-68,535943	
	5	1	97,1463286 [*]	1,2516345	0,000	93,354129	100,938529	
		2	92,7103286 [*]	1,2516345	0,000	88,918129	96,502529	
		3	85,9556000 [*]	1,2516345	0,000	82,163400	89,747800	
		4	72,3281429 [*]	1,2516345	0,000	68,535943	76,120343	
	Acenaftaleno	1	2	-4,8972571 [*]	,6271430	0,000	-6,797374	-2,997140
			3	-12,2863429 [*]	,6271430	0,000	-14,186460	-10,386226
			4	-29,0569429 [*]	,6271430	0,000	-30,957060	-27,156826
5			-109,5408714 [*]	,6271430	0,000	-111,440988	-107,640755	
2		1	4,8972571 [*]	,6271430	0,000	2,997140	6,797374	
		3	-7,3890857 [*]	,6271430	0,000	-9,289202	-5,488969	
		4	-24,1596857 [*]	,6271430	0,000	-26,059802	-22,259569	
		5	-104,6436143 [*]	,6271430	0,000	-106,543731	-102,743498	
3		1	12,2863429 [*]	,6271430	0,000	10,386226	14,186460	
		2	7,3890857 [*]	,6271430	0,000	5,488969	9,289202	
		4	-16,7706000 [*]	,6271430	0,000	-18,670717	-14,870483	
		5	-97,2545286 [*]	,6271430	0,000	-99,154645	-95,354412	
4		1	29,0569429 [*]	,6271430	0,000	27,156826	30,957060	
		2	24,1596857 [*]	,6271430	0,000	22,259569	26,059802	
		3	16,7706000 [*]	,6271430	0,000	14,870483	18,670717	
	5	-80,4839286 [*]	,6271430	0,000	-82,384045	-78,583812		
5	1	109,5408714 [*]	,6271430	0,000	107,640755	111,440988		
	2	104,6436143 [*]	,6271430	0,000	102,743498	106,543731		
	3	97,2545286 [*]	,6271430	0,000	95,354412	99,154645		
	4	80,4839286 [*]	,6271430	0,000	78,583812	82,384045		

Anexo B. (Continuación)

Compuesto	(I) NIVEL	(J) NIVEL	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Fenantreno	1	2	-5,4853857 [*]	,6953104	0,000	-7,592036	-3,378736
		3	-14,4478286 [*]	,6953104	0,000	-16,554479	-12,341178
		4	-30,5822286 [*]	,6953104	0,000	-32,688879	-28,475578
		5	-120,6721429 [*]	,6953104	0,000	-122,778793	-118,565493
	2	1	5,4853857 [*]	,6953104	0,000	3,378736	7,592036
		3	-8,9624429 [*]	,6953104	0,000	-11,069093	-6,855793
		4	-25,0968429 [*]	,6953104	0,000	-27,203493	-22,990193
		5	-115,1867571 [*]	,6953104	0,000	-117,293407	-113,080107
	3	1	14,4478286 [*]	,6953104	0,000	12,341178	16,554479
		2	8,9624429 [*]	,6953104	0,000	6,855793	11,069093
		4	-16,1344000 [*]	,6953104	0,000	-18,241050	-14,027750
		5	-106,2243143 [*]	,6953104	0,000	-108,330964	-104,117664
	4	1	30,5822286 [*]	,6953104	0,000	28,475578	32,688879
		2	25,0968429 [*]	,6953104	0,000	22,990193	27,203493
		3	16,1344000 [*]	,6953104	0,000	14,027750	18,241050
		5	-90,0899143 [*]	,6953104	0,000	-92,196564	-87,983264
	5	1	120,6721429 [*]	,6953104	0,000	118,565493	122,778793
		2	115,1867571 [*]	,6953104	0,000	113,080107	117,293407
		3	106,2243143 [*]	,6953104	0,000	104,117664	108,330964
		4	90,0899143 [*]	,6953104	0,000	87,983264	92,196564

ANEXO C

Anexo C. Porcentajes de recuperación para las curvas de calibración

NAFTALENO													
[] ppm curva 1	[] ppm curva 2	[] ppm curva 3	[] ppm curva 4	[] ppm curva 5	[] ppm curva 6	[] ppm curva 7	%R CURVA 1	%R CURVA 2	%R CURVA 3	%R CURVA 4	%R CURVA 5	%R CURVA 6	%R CURVA 7
2,11	2,22	2,16	2,13	2,19	2,06	2,13	105	111	108	107	110	103	106
5,22	5,32	5,46	5,38	5,28	4,84	5,19	104	106	109	108	106	96,7	104
10,2	10,2	10,6	10,4	9,4	9,6	9,4	102	102	106	104	93,7	95,6	93,7
19,3	19,1	18,5	18,8	20,1	20,6	20,3	96,6	95,3	92,5	94,2	101	103	102
70,1	70,2	70,3	70,2	70,0	69,9	70,0	100	100	100	100	100	100	100
ACENAFTALENO													
[] ppm curva 1	[] ppm curva 2	[] ppm curva 3	[] ppm curva 4	[] ppm curva 5	[] ppm curva 6	[] ppm curva 7	%R CURVA 1	%R CURVA 2	%R CURVA 3	%R CURVA 4	%R CURVA 5	%R CURVA 6	%R CURVA 7
2,02	2,06	2,00	2,02	2,20	2,15	2,13	101	103	100	101	110	108	106
4,81	4,88	4,91	4,89	5,48	5,43	5,44	96,3	97,6	98,2	97,9	110	109	109
9,80	9,68	9,86	9,84	9,48	9,71	9,52	98,0	96,8	98,6	98,4	94,8	97,1	95,2
20,5	20,5	20,3	20,3	19,7	19,6	19,8	102	102	101	101	98,7	97,9	99,1
69,9	69,9	69,9	69,9	70,1	70,1	70,1	100	100	100	100	100	100	100
FENANTRENO													
[] ppm curva 1	[] ppm curva 2	[] ppm curva 3	[] ppm curva 4	[] ppm curva 5	[] ppm curva 6	[] ppm curva 7	%R CURVA 1	%R CURVA 2	%R CURVA 3	%R CURVA 4	%R CURVA 5	%R CURVA 6	%R CURVA 7
2,21	2,18	2,08	2,06	2,04	2,17	2,07	110	109	104	103	102	109	104
5,11	5,15	5,09	5,09	5,32	5,46	5,42	102	103	102	102	106	109	108
9,88	9,83	9,96	9,98	10,6	10,7	10,3	98,8	98,3	100	100	106	107	103
19,7	19,8	19,8	19,8	18,7	18,3	19,1	98,6	98,8	99,0	99,1	93,7	91,5	95,3
70,1	70,1	70,1	70,0	70,2	70,3	70,2	100	100	100	100	100	100	100
FLUORENO													
[] ppm curva 1	[] ppm curva 2	[] ppm curva 3	[] ppm curva 4	[] ppm curva 5	[] ppm curva 6	[] ppm curva 7	%R CURVA 1	%R CURVA 2	%R CURVA 3	%R CURVA 4	%R CURVA 5	%R CURVA 6	%R CURVA 7
2,17	2,24	2,18	2,21	2,18	2,16	2,15	109	112	109	110	109	108	107
5,24	5,32	5,44	5,44	5,48	5,28	5,27	105	106	109	109	110	106	105
10,2	10,1	10,4	10,4	10,4	10,3	10,5	102	101	104	104	104	103	105
19,2	19,1	18,7	18,7	18,7	19,1	18,8	96,1	95,5	93,5	93,4	93,5	95,4	94,1
70,2	70,2	70,3	70,3	70,3	70,2	70,2	100	100	100	100	100	100	100
PIRENO													
[] ppm curva 1	[] ppm curva 2	[] ppm curva 3	[] ppm curva 4	[] ppm curva 5	[] ppm curva 6	[] ppm curva 7	%R CURVA 1	%R CURVA 2	%R CURVA 3	%R CURVA 4	%R CURVA 5	%R CURVA 6	%R CURVA 7
2,28	2,34	2,01	2,05	2,15	2,02	2,20	114	117	101	102	108	101	110
4,94	4,96	5,37	5,35	5,41	5,08	5,12	98,8	99,2	107	107	108	102	102
10,4	10,3	10,3	10,3	9,9	10,3	10,1	104	103	103	103	99	103	101
19,3	19,3	19,2	19,2	19,4	19,5	19,5	96,4	96,3	95,8	95,8	96,9	97,4	97,5
70,2	70,2	70,2	70,2	70,2	70,1	70,1	100	100	100	100	100	100	100