



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA**

**ESPECIALIDAD EN GESTION DE SISTEMAS DE CALIDAD**

**“TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL”**

**PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN GESTION DE SISTEMAS**

**DE CALIDAD**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO QUE DETERMINA  
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN AGUA  
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO”**

**AUTOR: JULIANA RINA VARGAS QUEZADA**

**TUTOR: Ing. Qco. JAIME FIERRO MSc.**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**SEPTIEMBRE 2016**

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL		
<b>TÍTULO</b> "Validación de un método analítico que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento"		
		<b>REVISORES:</b>
<b>INSTITUCIÓN:</b> Universidad de Guayaquil	<b>FACULTAD:</b> Ingeniería Química	
<b>CARRERA:</b> Especialidad en Gestión de Sistemas de Calidad		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b> 30 de septiembre de 2016	<b>Nº DE PÁGS.:</b>	
<b>ÁREA TEMÁTICA:</b> QUIMICA		
<b>PALABRAS CLAVES:</b> Validación, HAP's, HPLC Anova,		
<p><b>RESUMEN:</b> Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) se originan de procesamiento o combustión del petróleo. Son más de 100 analitos, pero 16 son los más estudiados por ser altamente cancerígenos en concentraciones bajas, a pesar de ser insolubles en el agua es necesaria su determinación en aguas potables, naturales y residuales. Con el desarrollo de un método instrumental, la definición del protocolo de validación y la evaluación de los resultados obtenidos estadísticamente se obtendrá un método analítico validado que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento. La extracción de los HAP's se realiza mediante la técnica de extracción en fase solida (SPE) en modalidad de cartuchos Oasis®HLB. La elución se hace con diclorometano y la concentración con un rotaevaporador lo que permite llegar a niveles más bajos de detección cumpliendo con los límites que la ley estipula.</p>		
<b>Nº DE REGISTRO (en base de datos):</b>	<b>Nº DE CLASIFICACIÓN:</b> Nº	
<b>DIRECCIÓN URL (tesis en la web):</b>		
<b>ADJUNTO PDF</b>	<input type="checkbox"/> <b>SI</b>	<input type="checkbox"/> <b>NO</b>
<b>CONTACTO CON AUTOR:</b> Juliana Vargas Quezada	<b>Teléfono:</b> 0985601671	<b>E-mail:</b> juliana_rina@hotmail.com
<b>CONTACTO DE LA INSTITUCIÓN</b> Facultad de Ingeniería Química	<b>Nombre:</b> Carrera de Ingeniería Química	
	<b>Teléfono:</b> 2292949	

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del estudiante Juliana Rina Vargas Quezada, del Programa de Especialidad en Gestión de Sistemas de Calidad, nombrado por el Decano de la Facultad de Ingeniería Química CERTIFICO: que el trabajo de titulación titulado Validación de un método analítico que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento, en opción al grado académico de Especialista en Gestión de Sistemas de Calidad, cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que establece el Reglamento aprobado para tal efecto.

**Atentamente**

---

**Tutor: Ing. Qco. Jaime Fierro MSc.**

Guayaquil, 30 de septiembre de 2016

## **DEDICATORIA**

Le dedico este trabajo a mis padres y hermana,  
porque siempre están apoyándome y  
alentándome a seguir adelante.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación especial, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

---

Juliana Vargas Quezada

## ABREVIATURAS

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HAP's: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fórmula Química de los 16 HAP's.....	10 y 11
Tabla 2: Condiciones de equipo HPLC.....	13
Tabla 3. Operacionalización de las variables.....	14
Tabla 4: Descripción de los 15 HAP's.....	16
Tabla 5: Preparación de curva de calibración.....	20

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 Diagrama de equipo HPLC.....	6
Figura 2: Diagrama de un inyector.....	8
Fifura 3: Equipo Manifold.....	20
Figura 4: HPLC THERMO ULTIMATE 3000.....	21
Figura 5: Cromatograma de los 15 HAP's .....	22

**Resumen:**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) se originan de procesamiento o combustión del petróleo. Son más de 100 analitos, pero 16 son los más estudiados por ser altamente cancerígenos en concentraciones bajas, a pesar de ser insolubles en el agua es necesaria su determinación en aguas potables, naturales y residuales. Con el desarrollo de un método instrumental, la definición del protocolo de validación y la evaluación de los resultados obtenidos estadísticamente se obtendrá un método analítico validado que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento. La extracción de los HAP's se realiza mediante la técnica de extracción en fase solida (SPE) en modalidad de cartuchos Oasis ®HLB. La elución se hace con diclorometano y la concentración con un rotaevaporador lo que permite llegar a niveles más bajos de detección cumpliendo con los límites que la ley estipula.

**Palabras clave:** validación, haps, hplc, anova

**ABSTRACT:**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) originate processing or burning oil. There are more than 100 analytes, but 16 are the most studied to be highly carcinogenic at low levels, despite being insoluble in water determination in drinking, natural and waste water is required. With the development of an instrumental method, the protocol definition validation and evaluation of results obtained statistically validated analytical method which determines polycyclic aromatic hydrocarbons in water by high performance liquid chromatography is obtained. Extracting the PAHs is performed by the technique of solid phase extraction (SPE) cartridges in Oasis ®HLB mode. Elution is done with

dichloromethane and concentration with rotary evaporator allowing to reach lower detection levels in compliance with the limits that the law stipulates.

### **Introducción**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) se originan de procesamiento o combustión del petróleo. Son más de 100 analitos, pero 16 son los más estudiados por ser altamente cancerígenos en concentraciones bajas, a pesar de ser insolubles en el agua es necesaria su determinación en aguas potables, naturales y residuales.

La cromatografía líquida de alta resolución tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra sea esta de origen farmacéutico, alimenticio, cosmético, forense, ambiental, es por tener estas características que se lo utiliza para determinar concentraciones bajas a nivel de trazas de compuestos como son los HAP's.

### **Delimitación del problema:**

La validación del método analítico cromatográfico se realizará bajo las directrices de la norma ISO/IEC 17025:2005 en la matriz agua residual doméstica, industrial, natural y potable.

### **Formulación del problema:**

El agua es un recurso natural no renovable que debe ser preservado y para determinar su calidad es necesario analizar varios parámetros que están estipulados en la ley de gestión ambiental entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Es necesaria la validación de un método que determine los hidrocarburos aromáticos policíclicos con un rango de trabajo que este dentro de los límites máximos permisibles que la ley estipula.

**Justificación:**

Validar un método analítico permite obtener valores de incertidumbre que nos acercan al valor verdadero en la cuantificación de los parámetros de estudio, pues toman en cuenta las desviaciones que pueden existir en el momento del ensayo sean estos ocasionados por los equipos, el personal o la aplicación del método, la contaminación con compuestos orgánicos como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el agua ponen en riesgo la salud de la población, de allí que su correcta identificación es indispensable.

**Objeto de estudio:**

La validación de un método normalizado EPA 550.1 que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua bajo la norma ISO 17025.

**Campo de acción o de investigación:**

La validación de un método en este caso cromatográfico nos permitirá definir si es confiable y reproducible además según los requerimientos establecidos en la norma ISO 17025 y llegar a un nivel más bajo de la normativa ambiental.

**Objetivo general:**

Validar de un método analítico que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante Cromatografía Líquida de alto rendimiento.

**Objetivos específicos:**

- ✓ Desarrollar un método instrumental en el equipo HPLC que permita identificar los HAP's. para muestras de agua

- ✓ Definir el protocolo de validación del método instrumental para determinar la incertidumbre del método.
- ✓ Obtener resultados y evaluarlos estadísticamente para la declaración del método como validado con su rango de aplicación.

**La novedad científica:**

La cromatografía de alta resolución nos permitirá ver hasta partes por billón (ppb) los hidrocarburos aromáticos policíclicos y mediante la validación se pretende dar a la sociedad un método que sea fácil de seguir y reproducible. “La validación es la confirmación mediante examen y la presentación de pruebas objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” (ISO/IEC 17025, 2005, p14).

# Capítulo 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Teorías generales

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica que permite separar mezclas complejas. La separación ocurre en una columna que tiene un relleno poroso (fase estacionaria) y la mezcla disuelta en un solvente (fase móvil) pasa a través de la columna. Los componentes (analitos) por su afinidad con el relleno de la columna salen en diferentes tiempos los cuales son registrados por un detector, esta información se ve reflejada en un Cromatograma.

La cromatografía líquida se clasifica por su fase estacionaria en cuatro técnicas:

#### **Cromatografía de Adsorción**

El principio de la cromatografía de adsorción se conoce de la columna clásica y la cromatografía en capa fina. Un material relativamente polar, con una alta superficie específica se utiliza como fase estacionaria y la fase móvil es relativamente no polar (heptano a tetrahidrofurano).

#### **Cromatografía de fase reversa**

La fase estacionaria es muy no polar. La fase móvil es relativamente polar (agua a tetrahidrofurano). Compuestos no polares se eluyen más tarde de compuestos polares.

#### **Cromatografía de intercambio iónico**

La fase estacionaria contiene grupos iónicos ( $\text{NR}_3^+$  o  $\text{SO}_3^-$ ) que interactúan con los grupos iónicos de las moléculas de la muestra. El método es adecuado para la separación de, por ejemplo, aminoácidos, productos metabólicos iónicos e iones orgánicos.

## La cromatografía de exclusión por tamaño

Este modo se puede subdividir en cromatografía de permeación en gel (con solventes orgánicos) y cromatografía de filtración en gel (con soluciones acuosas). cromatografía de exclusión por tamaño separa las moléculas, es decir, de acuerdo con la masa molecular. Las moléculas más grandes eluyen primero y después las moléculas más pequeñas. Este es el mejor método para elegir cuando una mezcla contiene compuestos con una diferencia de masa molecular de al menos 10%.

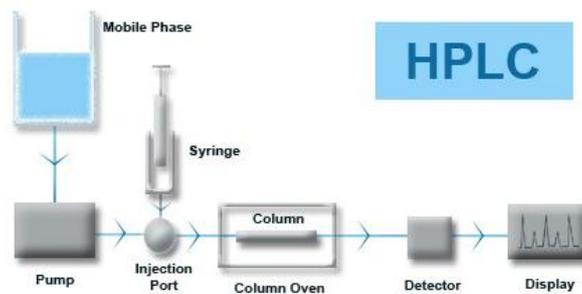
## Cromatografía iónica

La cromatografía iónica fue desarrollada como un medio de separación de los iones de ácidos fuertes y bases (por ejemplo,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ).

## Instrumento HPLC

Un instrumento de HPLC puede ser un conjunto de módulos o elementos individuales, pero puede ser diseñado como un único aparato también. Indiferente de su forma este consta de:

Figura 1: Diagrama de equipo HPLC



Fuente: <http://lab-training.com/>

## **Bomba**

Son necesarias para conseguir y regular la presión y velocidad de flujo de la fase móvil. La bomba se programa en proporciones diferentes para mezclar los solventes. Genera presiones por encima de los 6000 psi, libre de pulsaciones, reproducible y resistente a la corrosión.

## **Fase Móvil**

La fase móvil debe ser escogida por sus propiedades cromatográficas pues debe interactuar con una fase estacionaria adecuada para separar una mezcla de forma rápida y eficiente. Como regla general, una gama de solventes es potencialmente capaces de resolver cualquier problema particular, por lo que la selección debe basarse en diferentes criterios:

- ✓ Viscosidad: Un solvente de baja viscosidad produce una caída de presión más baja que un solvente con una mayor viscosidad para una velocidad de flujo específica.
- ✓ Transparencia UV: Si se utiliza un detector UV, la fase móvil debe ser completamente transparente a la longitud de onda requerida.
- ✓ Índice de refracción: sólo es importante si se utiliza un detector de índice de refracción.
- ✓ Punto de ebullición: El punto de ebullición deber ser bajo en el caso que se quiera trabajar con una fracción para evitar la pérdida de compuestos sensibles al calor.
- ✓ Pureza: Mientras más puro mejor el perfil cromatográfico que se obtenga y ayuda a la vida útil del equipo.

## **Sistema de inyección**

El ingreso de la muestra es uno de los aspectos críticos del HPLC, si la inyección no se realiza cuidadosamente origina un resultado erróneo, hay tres formas de inyección:

### a.- Inyectores de jeringa:

La muestra ingresa al sistema cromatográfico por medio de una jeringa que pasa a través de una membrana (septum) y es depositada directamente en la cabeza de la columna.

### b.- Inyectores de válvula

El bucle se llena con la muestra y el sello del rotor interno canalizada a continuación, se gira para llevar el bucle dentro del solvente. Estas válvulas son conocidas como válvulas de seis puertos, ya que tienen seis conexiones.

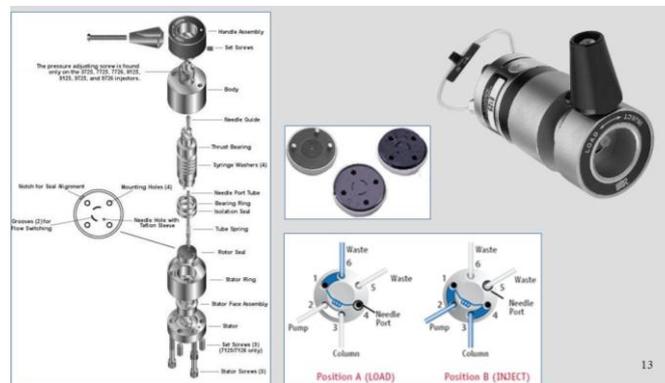


Figura 2: Diagrama de un inyector

Fuente: <http://slideplayer.es>

### c.- Inyector de sistema automático (automuestreador)

La base del automuestreador es la válvula de seis puertos también. Su bucle se llena parcialmente o totalmente como en la operación manual pero debido a que es automático se logra mayor precisión y reproducibilidad.

## Detectores

Los compuestos analizados son separados en la columna cromatográfica y detectados en forma continua usando diferentes tipos de detectores, estos deben ser escogidos considerando las

propiedades físico químicas. Algunos detectores son usados en HPLC algunos de ellos son ópticos, luminiscente, electroquímicos y espectrómetro de masas

#### a.- Detectores ópticos

El detector ultravioleta (UV) probablemente es el más popular y está basado en el uso de de una longitud de onda única o varias longitudes de ondas o arreglo de Diodos (DAD). En el detector UV la luz generada por una lámpara de deuterio 190-400 nm dividido en una sola longitud de onda que pasa a través de la celda del detector conteniendo la fase móvil y los componentes.

#### b.- Detectores luminiscentes

Otros detectores espectrofotométricos incluyen los fluorescentes y los quimiluminiscentes. Los detectores de fluorescencia son más sensibles que los detectores UV, pero su aplicación es limitada principalmente porque solo un reducido número de compuestos emiten fluorescencia.

La detección quimiluminiscentes es un detector sensible basado en la medida de una luz generada después de la columna por una reacción química entre los analitos y reactivos específicos.

#### c.- Detectores electroquímicos

Los detectores electroquímicos fueron desarrollados recientemente donde se maneja la fuerza transportando tanto la fase móvil como los analitos en un flujo electro osmótico en un campo eléctrico relativamente alto.

#### d.- Detectores de espectrómetro de masas

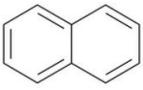
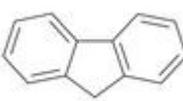
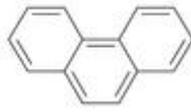
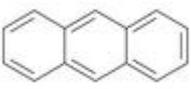
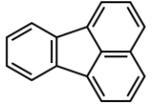
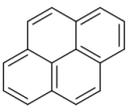
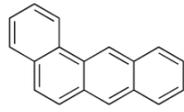
En el detector de espectrómetro de masas los analitos se detectan basándose en su peso molecular. La información obtenida es especialmente útil para la identificación de compuestos

estructurales. Sin embargo, su uso no se limita a la identificación de la estructura y se puede utilizar para cuantificar límites de detección muy bajos.

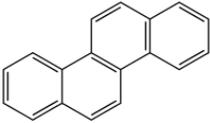
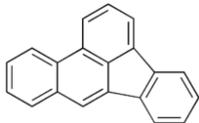
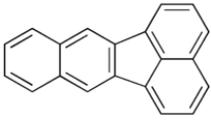
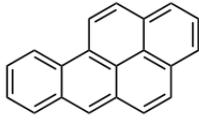
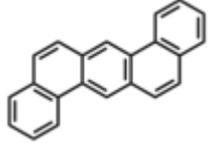
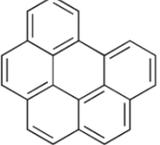
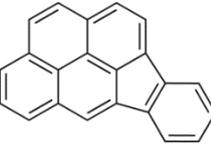
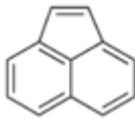
## 1.2 Teorías sustantivas

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son un grupo de sustancias químicas que se forman durante la combustión incompleta del carbón, petróleo, gas, madera, basura, u otras sustancias orgánicas, tales como el tabaco y la carne. Se encuentran a nivel de trazas en el aire, agua, suelo y sedimentos excepto cerca de su fuente y a pesar de que son relativamente insolubles en el agua debido a su naturaleza altamente peligrosa amerita su monitoreo en aguas potables, naturales y residuales. se refiere comúnmente a una clase grande de compuestos orgánicos que contienen sólo carbono e hidrógeno y se componen de dos o más anillos condensados aromáticos. A pesar de los efectos en la salud de los HAP's individuales no son exactamente iguales, pero sólo 16 han sido seleccionados por su alto grado de contaminación en base a su distribución y carcinogenicidad.

**Tabla 1: Fórmula Química de los 16 HAP's**

Naftaleno 	Acenafteno 	Fluoreno 	Fenantreno 
Antraceno 	Fluoranteno 	Pireno 	Benz (a) Antraceno 

Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/>

<p>Criseno</p> 	<p>Benzo (b) fluoranteno</p> 	<p>Benzo (k) fluoranteno</p> 	<p>Benzo (a) Pireno</p> 
<p>Dibenzo (a,h) antraceno</p> 	<p>Benzo (g,h,i) perileno</p> 	<p>Indeno (1,2,3-cd) pyrene</p> 	<p>Acenaftileno</p> 

### 1.3 Referentes empíricos

La norma, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayos ISO 17025:2005 indica que los métodos deben ser validados para confirmar que son adecuados para el fin previsto. Siendo este un requerimiento de norma nos encontramos con un método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable EPA 550 en la ciudad de México con un equipo HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, también encontramos una estandarización, validación y evaluación de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas del rio Cuyabeno en un equipo HPLC con detector UV-VIS y fluorescencia con el método EPA 550.1. Estas dos investigaciones validan un método normalizado, pero lo limitan a un solo tipo de agua.

## Capítulo 2

### MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Metodología:

Hernández (2010) afirma “El enfoque cuantitativo usa la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías” (p. 4)

De acuerdo con lo que Hernández afirma se propone validar un método que determina hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP's en aguas.

#### 2.2 Métodos:

Se valida el método analítico EPA 550.1 para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua, utilizando como técnica analítica la cromatografía líquida de alta resolución con un detector de fluorescencia.

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas más utilizadas en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y en combinación con el detector de fluorescencia se constituye en una herramienta esencial en el análisis de aguas. El detector de fluorescencia presenta la ventaja de ser sensible y específico en la identificación de sustancias desconocidas o en la confirmación de presencia de compuestos.

La extracción de los HAP's se realiza mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE) en modalidad de cartuchos Oasis ®HLB. La elución se hace con diclorometano y la concentración con un rotaevaporador lo que permite llegar a niveles más bajos de detección.

Se prepara solución stock de 16 HAP's a partir de estándares certificados la cual sirve para preparar las soluciones de curva de calibración y fortificar muestras de agua potable,

natural y residual. Se emplea un cromatógrafo HPLC 3000 THERMO con automuestreador, horno de columna y detector de fluorescencia.

**Tabla 2: Condiciones de equipo HPLC**

Cromatógrafo líquido	Ultimate 3000 THERMO																																	
Detector	Fluorescencia THERMO																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo</th> <th>Excitación (nm)</th> <th>Emisión (nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>255</td> <td>315</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>277</td> <td>330</td> </tr> <tr> <td>8.5</td> <td>247</td> <td>364</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>244</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>237</td> <td>460</td> </tr> <tr> <td>12.8</td> <td>237</td> <td>385</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>277</td> <td>376</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>255</td> <td>420</td> </tr> <tr> <td>24.2</td> <td>300</td> <td>415</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>250</td> <td>495</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	0	255	315	7	277	330	8.5	247	364	10	244	400	12	237	460	12.8	237	385	16	277	376	20	255	420	24.2	300	415	27	250	495
Tiempo	Excitación (nm)	Emisión (nm)																																
0	255	315																																
7	277	330																																
8.5	247	364																																
10	244	400																																
12	237	460																																
12.8	237	385																																
16	277	376																																
20	255	420																																
24.2	300	415																																
27	250	495																																
Columna	Hypersil Green PAH en mm 150*4.6 tamaño de partícula 5 µm																																	
Fase móvil	(A) Agua (B) Acetonitrilo																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo</th> <th>Flujo</th> <th>% A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>2 ml/min</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>2 ml/min</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>2 ml/min</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>2 ml/min</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo	Flujo	% A	%B	0	2 ml/min	50	50	5	2 ml/min	50	50	30	2 ml/min	1	99	31	2 ml/min	50	50													
Tiempo	Flujo	% A	%B																															
0	2 ml/min	50	50																															
5	2 ml/min	50	50																															
30	2 ml/min	1	99																															
31	2 ml/min	50	50																															
Horno de columna	28 °C																																	
Duración de la corrida	31 minutos																																	

Fuente: Autor

### 2.3 Hipótesis

La validación de un método analítico para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía líquida de alta de resolución se puede realizar en diferentes matrices de agua: natural, potable y residual y poder detectar niveles más bajos que los límites permisibles que están en las normas de calidad del agua.

## 2.4 Universo y muestra

El desarrollo de la validación se realizará en la ciudad de Guayaquil y se tomarán muestras de agua de origen natural del río Daule, potable de la zona norte, doméstica (planta de tratamiento) e industrial (efluente de gasolinera)

## 2.5 CDIU – Operacionalización de variables

**Tabla 3. Operacionalización de las variables**

<b>Variables</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Unidades</b>	<b>Instrumentos</b>
Tiempo de retención	dependiente	minutos	HPLC
Flujo	independiente	ml/min	HPLC
Temperatura	independiente	C	HPLC

## 2.6 Gestión de datos

Los datos obtenidos en el software Chromeleon serán evaluados estadísticamente mediante Análisis de Varianza (ANOVA). Esta es una técnica estadística usada para separar y calcular la variación debido a los errores aleatorios de la medición de la variación causada por cualquier otro factor que podría introducir cambios en la medida de la concentración de las muestras. Con los valores obtenidos de la precisión y el error sistemático se calcula la incertidumbre de la medición. El programa elaborado en Excel efectúa el cálculo de los parámetros estadísticos de interés. En la hoja de cálculo (ANOVA) se calcula la posición determinada por los errores aleatorios.

## 2.7 Criterios éticos de la investigación

La investigación se efectuará en un laboratorio ambiental acreditado en la norma ISO 17025 de la ciudad de Guayaquil en busca de la acreditación de estos parámetros. Se realizará cinco repeticiones en tres días diferentes.

## Capítulo 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Antecedentes de la unidad de análisis o población

Las muestras fortificadas que se utilizaran son provenientes del Rio Daule para la matriz de agua natural, un efluente de gasolinera para la matriz de agua residual industrial, efluente de planta de tratamiento para la matriz de agua residual doméstica y agua potable de una casa.

#### 3.2 Diagnostico o estudio de campo:

Se obtienen cromatogramas con la separación de los 15 HAP's en estudio tanto en las matrices fortificadas de agua natural, residual y potable como en los estándares. Los parámetros estadísticos que se generan como resultado son repetibilidad, reproducibilidad, incertidumbre, límite de detección y cuantificación. No se identifican valores menores a 0,002  $\mu\text{g/l}$  por lo tanto el límite de detección (LD) es igual al límite de cuantificación (LC) 0,002  $\mu\text{g/l}$ . Los contaminantes de los solventes y el material de vidrio son interferencias positivas en el método las cuales se corrigen al correr en forma paralela un blanco, el intervalo de trabajo es de 0,002  $\mu\text{g/l}$  a 0,08  $\mu\text{g/l}$ , excepto para el naftaleno que va desde 0,008  $\mu\text{g/l}$  a 0,08  $\mu\text{g/l}$ . Se obtienen los valores de incertidumbre para los 15 HAP's: para el Naftaleno 35,62%, Acenafteno 46,01%, Fluoreno 34,21%, Fenantreno 26,92%, Antraceno 46,01%, Fluoranteno 34,75%, Pireno 37,73%, Benzo (a) antraceno 34,21%, Criseno 37,73%, Benzo (b) fluoranteno 32,35%, Benzo (a) pireno 37,73%, Dibenzo (a,h) antraceno 32,05%, Benzo (g,h,i) perileno 26,92%, Indeno (1,2,3-cd) pireno 46,01%.

**Tabla 4: Descripción de los 15 HAP's**

<b>Parámetro</b>	<b>Rango de trabajo en µg/l</b>
Naphthalene	0,008 – 0,08
Acenaphthene	0,002 – 0,08
Fluorene	0,002 – 0,08
Phenanthrene	0,002 – 0,08
Anthracene	0,002 – 0,08
0,0001 – 0,08	0,002 – 0,08
Pyrene	0,002 – 0,08
Benzo (a) Anthracene	0,002 – 0,08
Chrysene	0,002 – 0,08
Benzo (b) fluoranthene	0,002 – 0,08
Benzo (k) fluoranthene	0,002 – 0,08
Benzo (a) Pyrene	0,002 – 0,08
Dibenzo (a,h) anthracene	0,002 – 0,08
Benzo (g,h,i) Perylene	0,002 – 0,08
Indeno (1,2,3-cd) pyrene	0,002 – 0,08

## **Capítulo 4**

### **DISCUSIÓN**

#### **4.1 Contrastación empírica:**

Se fijaron objetivos de validación en repetibilidad  $\leq 25\%$  y de reproducibilidad  $\leq 30\%$  obteniéndose 5,59 % como el más alto en el Indeno (1,2,3 cd) Pireno y de 2,80% en el Fenantreno. En reproducibilidad el más alto 6,58% en Indeno (1,2,3 cd) Pireno y de 3,96% como el más bajo en el Fluoranteno. Siendo estos datos menores que los datos obtenidos por los referentes empíricos. Estos datos se obtuvieron por medio de la anova que se realizó con las tres repeticiones durante cinco días. Ver Anexo 1.

#### **4.2 Limitaciones:**

De los 16 HAP's en estudio queda establecida la validación del método para 15 HAP's que son los analitos que se pueden detectar y cuantificar en el detector de fluorescencia a excepción del Acenaftileno que solo se puede detectar por el detector UV-Vis.

#### **4.3 Líneas de investigación:**

Esta investigación se realiza en 15 HAP's y puede ser ampliada a analizar mayor cantidad de hidrocarburos en menos tiempo.

#### **4.4 Aspectos relevantes**

Metodología amigable con el ambiente debido a que no emana vapores y los residuos líquidos que genera son colectados y eliminados a través de un gestor ambiental, es fácil de aprender y adaptar.

## **Capítulo 5**

### **PROPUESTA**

La validación de un método analítico cromatográfico el cual se realizará bajo las directrices de la norma ISO/IEC 17025:2005 en la matriz agua residual doméstica, industrial, natural y potable, tiene por objeto generar un procedimiento el cual se detalla a continuación:

#### **1. Alcance**

Este procedimiento será aplicado a muestras de agua residual industrial, aguas naturales y potables.

#### **2. Interferencias y tratamiento**

Las interferencias del método pueden ser los contaminantes en los solventes, material de vidrio los cuales pueden elevar la línea base en el cromatograma. Se debe demostrar que no hay interferencias mediante la corrida de un blanco por cada lote de muestras corridas.

#### **3. Equipos y materiales**

- ✓ HPLC 3000 – THERMO EI-292 y sus accesorios (horno de columna y automuestreador)
- ✓ Equipo manifold
- ✓ Campana de extracción
- ✓ Columna Hypersil Green PAHD in (mm) 150 \* 4,6 Particle Sz. (5 $\mu$ )
- ✓ Equipo de filtración en vacío (kitasato y embudo de vidrio)
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Pipetas automáticas
- ✓ Baño ultrasónico

- ✓ Rota evaporador
- ✓ Viales capacidad 2 ml
- ✓ Matraces volumétricos 10, 50 y 100 ml utilizados para la preparación de estándares no deben tener daño que comprometa el volumen del mismo
- ✓ Pipetas graduadas y volumétricas
- ✓ Membrana HV (Durapore) en PVDF 0.45 µm de poro 47 mm de diámetro
- ✓ Cartuchos de extracción OASIS HLB 6 cc (200 mg)
- ✓ Vasos de precipitación
- ✓ Filtros de jeringa 0,2 µm
- ✓ Jeringas comerciales descartables de 3, 5 ó 10 ml

#### 4. Reactivos

- ✓ Metanol grado HPLC
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC
- ✓ Agua tipo I

#### 5. Preparación de reactivos

##### A. Solución stock de HAP's:

1. Si el fabricante declara la forma de preparación, proceder siguiendo las directrices dadas por el mismo.
2. Si el fabricante no declara la forma de preparación y solo proporciona la concentración y solvente, realizar la solución stock según requerimiento analítico en base a la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

## B. Soluciones estándar de HAP'S

Diluya 1 ml de solución stock de HAP's a 10 ml.

$$1 \mu\text{g/ml} = 1,0 \text{ mg/l HAP's}$$

A partir de aquí prepare estándares de calibración, según la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Para la preparación de las diferentes concentraciones de la curva de calibración para un volumen final de 10 ml (V2), tomar los siguientes volúmenes:

**Tabla 5: Preparación de curva de calibración**

Concentración C <sub>2</sub> (mg/l)	Volumen V <sub>1</sub> (ml)
0,001	0,010
0,005	0,050
0,010	0,100
0,050	0,500
0,100	1,000

## 6. Preparación de la muestra

1. Acondicionamiento del cartucho OASIS agregando 5 ml de diclorometano grado HPLC.

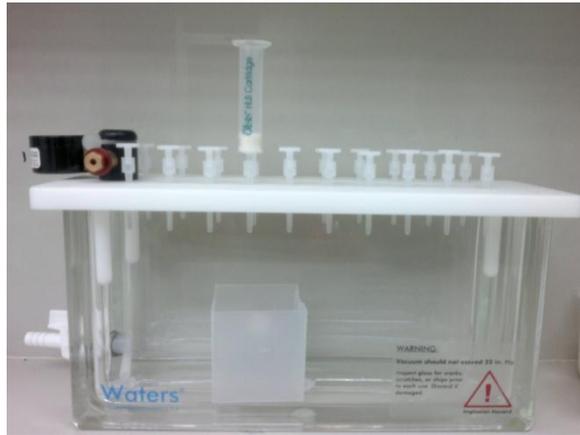


Figura 3: Equipo Manifold

Fuente: Autor

2. Enjuague con 5 ml de metanol grado HPLC y luego 5 ml de agua tipo I
3. Cargar 500 ml de muestra a 15 ml/min, tiempo aproximación de filtración 33 minutos
4. Lavar con 5 ml agua tipo I
  5. Eluir con 8 ml de diclorometano: 5 ml enjuagar la botella y 3 ml en el cartucho
6. Evaporar a sequedad
7. Reconstituir con 2 ml de ACN y colocarlo en un vial de 2 ml
8. La Inyección del extracto se realiza en el HPLC



Figura 4: HPLC Thermo Ultimate 3000

Fuente: [www.directindustry.com](http://www.directindustry.com)

9. Los resultados son integrados automáticamente por el software

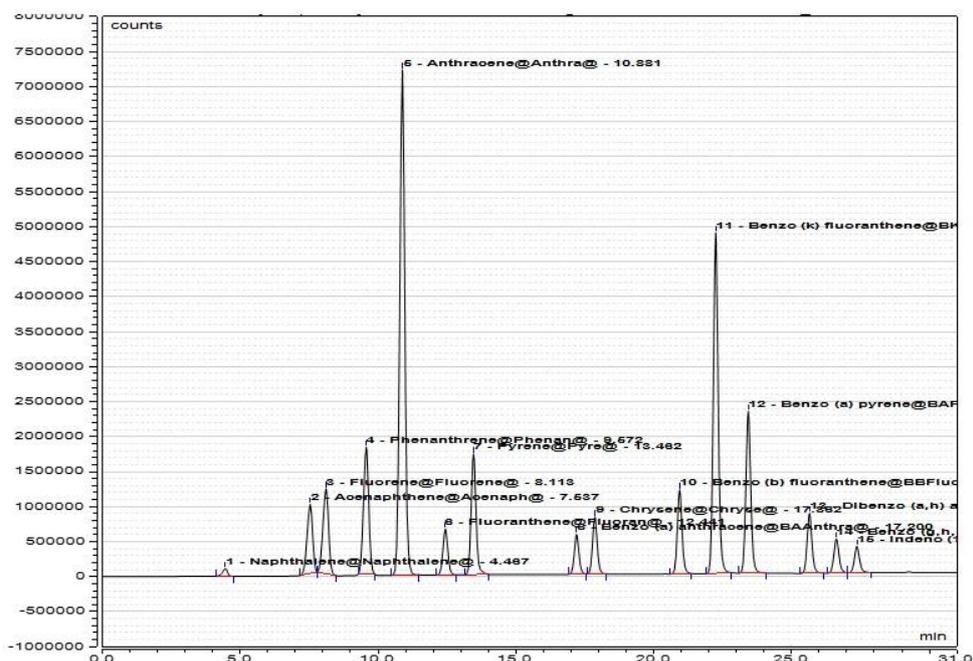


Figura 5: Cromatograma de los 15 HAP's

Fuente: Autor

## Validación y Cálculo de la incertidumbre

La parte fundamental en la validación de un método que determine los hidrocarburos aromáticos policíclicos con un rango de trabajo que este dentro de los límites máximos permisibles que la ley estipula es el diseño experimental que consta de:

### Precisión de Repetibilidad

Analizar materiales de referencia internos preparados a partir de blancos fortificados a diferentes concentraciones (cinco niveles de concentración) en el intervalo de trabajo, trabajar por quintuplicado en cada nivel. Las condiciones de Repetibilidad son mismo analista, equipo y laboratorio en un periodo de tiempo corto. Determinar la desviación estándar por Repetibilidad en cada concentración. Ver anexo 1.

## **Precisión de Reproducibilidad**

Repetición del diseño anterior en días y analistas distintos, mismo laboratorio en condiciones de reproducibilidad. Determinar la desviación estándar por Reproducibilidad en cada concentración. Ver Anexo 1.

## **Límite de Detección**

Analizar un blanco de agua grado hplc, 5 repeticiones por analista. Ver Anexo 1.

## **Tratamiento estadístico**

Análisis de varianza ANOVA y la obtención de:

- ✓ Intervalo de trabajo validado
- ✓ Incertidumbre.
- ✓ Desviación estándar de repetibilidad ( $s_r$ )
- ✓ Desviación estándar de reproducibilidad ( $s_R$ )

$$✓ S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

- ✓ Desviación estándar relativa de repetibilidad (% $RSD_r$ )
- ✓ Desviación estándar relativa de reproducibilidad (% $RSD_R$ )
- ✓ %  $RSD = \frac{S}{\bar{X}}$
- ✓ % de recuperación
- ✓ % de exactitud

## **Conclusiones**

- ✓ El desarrollo un método analítico instrumental en el equipo HPLC nos permite identificar 15 HAP's con buena resolución y simetría.
- ✓ La definición del protocolo de validación ha permitido tener las pautas para realizar el número de repeticiones las cuales generan los datos que permiten realizar el análisis estadístico.
- ✓ Después del desarrollo de la investigación y el análisis estadístico de los resultados se declara el método analítico cromatográfico como validado con su respectivo rango de aplicación.

## **Recomendaciones**

- ✓ Realizar una validación con diferentes tipos de columna para que haya mayor variabilidad y evitar estar sujeto a depender de un solo fabricante.
- ✓ Ampliar el rango de la validación a otro tipo de matrices como por ejemplo aguas marinas.
- ✓ Se recomienda que el organismo de control supervise el cumplimiento de las normas regulatorias en los diferentes tipos de agua.
- ✓ No reutilizar solventes recuperados en el análisis cromatográfico debido a que puede ocasionar una desviación de los resultados y en corto plazo un daño en el equipo HPLC.

## Bibliografía

1. ISO/ IEC 17005:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración
2. Kromidas, S., (2004), *Practical Problem Solving in HPLC*, Saarbrücken, Alemania, Wiley-VCH
3. Velásquez, Verónica., Estandarización, validación y evaluación de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas del rio Cuyabeno, Laboratorio Centrocésal, Universidad de las fuerzas-ESPE, departamento de ciencias de la vida, carrera de ingeniería en biotecnología.
4. Moroles, N. (2001). Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. CIENCIA UANL. Volumen (4), 420-425
5. [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_liquida\\_de\\_alta\\_eficacia.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf)
6. <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-5/>
7. <http://slideplayer.es/slide/10757394/>
8. Food Analysis by HPLC Third edition 2013 CRC Press por Taylor & Francis Group editado por Leo M.L. Nollet, Fidel Toldra
9. <http://shodexhplc.com/lessons/leccion-6-los-detectores-para-hplc/?lang=es>
10. Agency for Toxic Substances and Disease Registry(ATSDR)Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) August 1995.
11. International agency for research of cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 92 (2010) Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures
12. <http://es.slideshare.net/robles585/la-investigacin-cuantitativa>

13. [www.directindustry.com](http://www.directindustry.com)

14. <http://www.sigmaldrich.com/>

## ANEXOS

### Anexo 1

NAFTALENO							
FUNCIÓN DE RESPUESTA	INSTRUMENTAL				DEL MÉTODO		
Ecuación de linealidad	$Y = 228785,848 X + 29,411$				<b>n-a</b>		
<b>R2</b>	<b>1,000</b>				<b>n-a</b>		
Recuperación en %	<b>n-a</b>				<b>101,66</b>		
PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,008	0,00018	2,29	0,00019	2,31	100,25	0,0014	17,18
0,014	0,00028	2,01	0,00031	2,22	99,91	0,0014	10,30
0,025	0,00096	3,80	0,00096	3,81	100,82	0,0023	9,33
0,080	0,00044	0,55	0,00044	0,55	100,05	0,0018	2,31
0,015	0,00107	7,42	0,00132	9,09	96,51	0,0031	20,70
0,030	0,00121	3,68	0,00137	4,17	111,28	0,0033	10,86
0,060	0,01047	16,97	0,01047	16,97	102,80	0,0214	35,62
Global	n-a	5,25	n-a	5,59	101,66	n-a	<b>35,62</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación				No se identifican valores menores a 0,008 µg/l por lo tanto LD=LC 0,008 µg/l			
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible							

ACENAFTENO		
FUNCIÓN DE RESPUESTA	INSTRUMENTAL	DEL MÉTODO
Ecuación de linealidad	$Y = 884480,425 X - 330,829$	n-a
R2	1,000	n-a
Recuperación en %	n-a	104,98

PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00014	6,99	0,00014	6,99	98,40	0,0009	46,01
0,008	0,00050	6,42	0,00050	6,45	97,75	0,0013	16,50
0,014	0,00048	3,45	0,00048	3,49	98,54	0,0013	8,98
0,025	0,00031	1,24	0,00033	1,31	100,03	0,0010	4,01
0,080	0,00061	0,77	0,00061	0,77	99,65	0,0017	2,18
0,015	0,00147	8,31	0,00225	12,75	125,60	0,0052	34,92
0,030	0,00295	8,33	0,00363	10,25	118,09	0,0075	24,86
0,060	0,00564	9,23	0,00651	10,66	101,81	0,0134	22,40
Global	n-a	5,59	n-a	6,58	104,98	n-a	<b>46,01</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>FLUORENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 1142308,961 X - 206,986$	<b>n-a</b>
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>101,95</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
<b>Nivel (µg/l)</b>	<b>Repetibilidad</b>		<b>Reproducibilidad</b>		<b>Veracidad</b>	<b>U</b>	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00016	7,95	0,00017	8,29	102,06	0,0007	34,21
0,008	0,00038	4,80	0,00038	4,80	100,20	0,0010	12,03
0,014	0,00044	3,19	0,00045	3,20	99,40	0,0011	7,51
0,025	0,00049	1,96	0,00051	2,05	99,33	0,0012	4,61
0,080	0,00045	0,56	0,00049	0,61	99,88	0,0013	1,63
0,015 <sup>1</sup>	0,00127	8,95	0,00157	11,09	93,60	0,0033	22,24
0,030 <sup>2</sup>	0,00127	3,49	0,00244	6,69	121,71	0,0050	16,67
0,060 <sup>3</sup>	0,00259	4,35	0,00285	4,78	99,44	0,0059	9,87
Global	n-a	4,41	n-a	5,19	101,95	n-a	<b>34,21</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>FENANTRENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 4222615,444 X - 411,388$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>98,41</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
<b>Nivel (µg/l)</b>	<b>Repetibilidad</b>		<b>Reproducibilidad</b>		<b>Veracidad</b>	<b>U</b>	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00014	6,61	0,00014	6,61	102,38	0,0005	25,04
0,008	0,00017	2,11	0,00017	2,13	99,65	0,0005	6,56
0,014	0,00020	1,40	0,00020	1,40	99,94	0,0005	3,91
0,025	0,00034	1,35	0,00034	1,36	99,87	0,0008	3,13
0,080	0,00046	0,58	0,00046	0,58	99,93	0,0011	1,39
0,015 <sup>1</sup>	0,00145	10,14	0,00195	13,58	95,69	0,0040	26,92
0,030 <sup>2</sup>	0,00033	1,06	0,00181	5,76	104,42	0,0037	12,37
0,060 <sup>3</sup>	0,00068	1,11	0,00074	1,22	85,40	0,0016	2,69
Global	n-a	3,04	n-a	4,08	98,41	n-a	<b>26,92</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

ANTRACENO		
FUNCIÓN DE RESPUESTA	INSTRUMENTAL	DEL MÉTODO
Ecuación de linealidad	$Y = 884480,425 X - 330,829$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>104,98</b>

PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00014	6,99	0,00014	6,99	98,40	0,0009	46,01
0,008	0,00050	6,42	0,00050	6,45	97,75	0,0013	16,50
0,014	0,00048	3,45	0,00048	3,49	98,54	0,0013	8,98
0,025	0,00031	1,24	0,00033	1,31	100,03	0,0010	4,01
0,080	0,00061	0,77	0,00061	0,77	99,65	0,0017	2,18
0,015	0,00147	8,31	0,00225	12,75	125,60	0,0052	34,92
0,030	0,00295	8,33	0,00363	10,25	118,09	0,0075	24,86
0,060	0,00564	9,23	0,00651	10,66	101,81	0,0134	22,40
Global	n-a	5,59	n-a	6,58	104,98	n-a	<b>46,01</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>FLUORANTENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 3349827,375 X - 457,361$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>102,17</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel ( $\mu\text{g/l}$ )	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 ( $\mu\text{g/l}$ )	En %
0,002	0,00012	6,10	0,00012	6,12	97,60	0,0007	34,75
0,008	0,00016	1,95	0,00016	1,99	99,75	0,0007	8,65
0,014	0,00018	1,31	0,00018	1,32	99,74	0,0007	4,95
0,025	0,00023	0,93	0,00026	1,05	99,92	0,0008	3,07
0,080	0,00035	0,44	0,00035	0,44	100,03	0,0012	1,45
0,015	0,00138	9,54	0,00195	13,51	96,31	0,0041	27,12
0,030	0,00034	0,97	0,00211	6,04	116,71	0,0043	14,47
0,060	0,00075	1,17	0,00080	1,24	107,31	0,0018	3,03
Global	n-a	2,80	n-a	3,96	102,17	n-a	<b>34,75</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 $\mu\text{g/l}$ por lo tanto LD=LC; 0,002 $\mu\text{g/l}$				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>PIRENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 1394092,232 X - 133,853$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	n-a
Recuperación en %	n-a	<b>101,42</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	k=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00019	9,43	0,00019	9,47	95,30	0,0008	37,73
0,008	0,00027	3,39	0,00027	3,40	99,55	0,0008	10,26
0,014	0,00038	2,70	0,00038	2,70	100,23	0,0010	6,90
0,025	0,00026	1,05	0,00029	1,16	99,79	0,0008	3,23
0,080	0,00043	0,54	0,00051	0,64	99,84	0,0014	1,72
0,015 <sup>1</sup>	0,00137	9,77	0,00188	13,43	93,11	0,0039	26,14
0,030	0,00200	5,50	0,00299	8,22	121,33	0,0061	20,43
0,060	0,00195	3,18	0,00229	3,73	102,24	0,0048	7,95
Global	n-a	4,44	n-a	5,34	101,42	n-a	<b>37,73</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>BENZO (A) ANTRACENE</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 1142308,961 X - 206,986$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	n-a	<b>101,95</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00016	7,95	0,00017	8,29	102,06	0,0007	34,21
0,008	0,00038	4,80	0,00038	4,80	100,20	0,0010	12,03
0,014	0,00044	3,19	0,00045	3,20	99,40	0,0011	7,51
0,025	0,00049	1,96	0,00051	2,05	99,33	0,0012	4,61
0,080	0,00045	0,56	0,00049	0,61	99,88	0,0013	1,63
0,015	0,00127	8,95	0,00157	11,09	93,60	0,0033	22,24
0,030	0,00127	3,49	0,00244	6,69	121,71	0,0050	16,67
0,060	0,00259	4,35	0,00285	4,78	99,44	0,0059	9,87
Global	n-a	4,41	n-a	5,19	101,95	n-a	<b>34,21</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>CRISENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 1394092,232 X - 133,853$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	n-a
Recuperación en %	n-a	<b>101,42</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	k=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00019	9,43	0,00019	9,47	95,30	0,0008	37,73
0,008	0,00027	3,39	0,00027	3,40	99,55	0,0008	10,26
0,014	0,00038	2,70	0,00038	2,70	100,23	0,0010	6,90
0,025	0,00026	1,05	0,00029	1,16	99,79	0,0008	3,23
0,080	0,00043	0,54	0,00051	0,64	99,84	0,0014	1,72
0,015	0,00137	9,77	0,00188	13,43	93,11	0,0039	26,14
0,030	0,00200	5,50	0,00299	8,22	121,33	0,0061	20,43
0,060	0,00195	3,18	0,00229	3,73	102,24	0,0048	7,95
Global	n-a	4,44	n-a	5,34	101,42	n-a	<b>37,73</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>BENZO (b) FLUORANTENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 2541199,217 X - 268,824$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>102,80</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00013	6,32	0,00013	6,33	102,82	0,0006	32,35
0,008	0,00051	6,18	0,00051	6,20	102,70	0,0012	14,70
0,014	0,00030	2,12	0,00032	2,25	100,35	0,0008	5,94
0,025	0,00040	1,61	0,00041	1,63	99,89	0,0010	3,89
0,080	0,00038	0,47	0,00052	0,65	99,98	0,0013	1,68
0,015	0,00140	9,80	0,00197	13,78	95,33	0,0041	27,35
0,030	0,00037	1,02	0,00224	6,20	120,53	0,0046	15,29
0,060	0,00083	1,38	0,00088	1,45	100,80	0,0019	3,22
Global	n-a	3,61	n-a	4,81	102,80	n-a	<b>32,35</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>BENZO (k) FLUORANTENE</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 884480,425 X - 330,829$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>104,98</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00014	6,99	0,00014	6,99	98,40	0,0009	46,01
0,008	0,00050	6,42	0,00050	6,45	97,75	0,0013	16,50
0,014	0,00048	3,45	0,00048	3,49	98,54	0,0013	8,98
0,025	0,00031	1,24	0,00033	1,31	100,03	0,0010	4,01
0,080	0,00061	0,77	0,00061	0,77	99,65	0,0017	2,18
0,015	0,00147	8,31	0,00225	12,75	125,60	0,0052	34,92
0,030	0,00295	8,33	0,00363	10,25	118,09	0,0075	24,86
0,060	0,00564	9,23	0,00651	10,66	101,81	0,0134	22,40
Global	n-a	5,59	n-a	6,58	104,98	n-a	<b>46,01</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>BENZO (a) PIRENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 1394092,232 X - 133,853$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>101,42</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	k=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00019	9,43	0,00019	9,47	95,30	0,0008	37,73
0,008	0,00027	3,39	0,00027	3,40	99,55	0,0008	10,26
0,014	0,00038	2,70	0,00038	2,70	100,23	0,0010	6,90
0,025	0,00026	1,05	0,00029	1,16	99,79	0,0008	3,23
0,080	0,00043	0,54	0,00051	0,64	99,84	0,0014	1,72
0,015 <sup>1</sup>	0,00137	9,77	0,00188	13,43	93,11	0,0039	26,14
0,030	0,00200	5,50	0,00299	8,22	121,33	0,0061	20,43
0,060	0,00195	3,18	0,00229	3,73	102,24	0,0048	7,95
Global	n-a	4,44	n-a	5,34	101,42	n-a	<b>37,73</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>DIBENZO (a,h) ANTRACENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 1867743,371 X - 474,158$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	<b>n-a</b>	<b>102,29</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00013	6,60	0,00013	6,60	101,42	0,0006	32,05
0,008	0,00039	4,98	0,00040	5,00	98,75	0,0010	12,17
0,014	0,00201	14,76	0,00203	14,94	97,03	0,0042	29,83
0,025	0,00038	1,51	0,00038	1,53	100,30	0,0009	3,70
0,080	0,00050	0,63	0,00051	0,64	99,82	0,0013	1,66
0,015	0,00144	10,25	0,00191	13,60	93,56	0,0040	26,54
0,030	0,00039	1,05	0,00238	6,39	124,40	0,0049	16,24
0,060	0,00184	2,97	0,00194	3,14	103,06	0,0041	6,76
Global	n-a	5,34	n-a	6,48	102,29	n-a	<b>32,05</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>BENZO (g,h,i) PERILENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 4222615,444 X - 411,388$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	n-a	<b>98,41</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel (µg/l)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 (µg/l)	En %
0,002	0,00014	6,61	0,00014	6,61	102,38	0,0005	25,04
0,008	0,00017	2,11	0,00017	2,13	99,65	0,0005	6,56
0,014	0,00020	1,40	0,00020	1,40	99,94	0,0005	3,91
0,025	0,00034	1,35	0,00034	1,36	99,87	0,0008	3,13
0,080	0,00046	0,58	0,00046	0,58	99,93	0,0011	1,39
0,015	0,00145	10,14	0,00195	13,58	95,69	0,0040	26,92
0,030	0,00033	1,06	0,00181	5,76	104,42	0,0037	12,37
0,060	0,00068	1,11	0,00074	1,22	85,40	0,0016	2,69
Global	n-a	3,04	n-a	4,08	98,41	n-a	<b>26,92</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación			No se identifican valores menores a 0,002 µg/l por lo tanto LD=LC; 0,002 µg/l.				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							

<b>INDENO (1,2,3-cd) PIRENO</b>		
<b>FUNCIÓN DE RESPUESTA</b>	<b>INSTRUMENTAL</b>	<b>DEL MÉTODO</b>
Ecuación de linealidad	$Y = 884480,425 X - 330,829$	n-a
<b>R2</b>	<b>1,000</b>	<b>n-a</b>
Recuperación en %	n-a	<b>104,98</b>

<b>PRECISIÓN, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE</b>							
Nivel ( $\mu\text{g/l}$ )	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad	U	
	Sr	% CVr	SR	% CVR	% Recup	K=2 ( $\mu\text{g/l}$ )	En %
0,002	0,00014	6,99	0,00014	6,99	98,40	0,0009	46,01
0,008	0,00050	6,42	0,00050	6,45	97,75	0,0013	16,50
0,014	0,00048	3,45	0,00048	3,49	98,54	0,0013	8,98
0,025	0,00031	1,24	0,00033	1,31	100,03	0,0010	4,01
0,080	0,00061	0,77	0,00061	0,77	99,65	0,0017	2,18
0,015	0,00147	8,31	0,00225	12,75	125,60	0,0052	34,92
0,030	0,00295	8,33	0,00363	10,25	118,09	0,0075	24,86
0,060	0,00564	9,23	0,00651	10,66	101,81	0,0134	22,40
Global	n-a	5,59	n-a	6,58	104,98	n-a	<b>46,01</b>
<b>LIMITE DE DETECCIÓN (L.D.)</b> Tomado del límite de cuantificación.			No se identifican valores menores a 0,002 $\mu\text{g/l}$ por lo tanto LD=LC; 0,002 $\mu\text{g/l}$ .				
<b>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)</b> Verificado experimentalmente hasta obtener el mínimo valor posible.							