



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CARRERA: QUÍMICA AMBIENTAL**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO(A) EN: QUÍMICA
AMBIENTAL**

TÍTULO: Validación y Estimación de la Incertidumbre de una Metodología Analítica para Determinar la Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo en Agua, en el Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua, Septiembre 2016-Noviembre 2017.

Autores:

Br (a): Calero Blandón Glenda Michel

Br (a): Morales Fernández Kendys Scarleth

Tutor:

Lcdo. Josseth Díaz Domínguez

Asesor:

Lcda. Gioconda Matus Rodríguez

Managua, Enero 2018

Validación y Estimación de la Incertidumbre de una Metodología Analítica para Determinar la Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo en Agua, en el Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua, Septiembre 2016-Noviembre 2017.

Dedicatoria

Dedico esta Monografía principalmente a Dios, por estar siempre a mi lado dándome la fortaleza, sabiduría y salud estando siempre conmigo a lo largo de mi vida, por guiarme siempre por el buen camino y dándome éxito en esta etapa.

A mis padres, Marlenis Blandón y Egver Calero por apoyarme y motivarme constantemente en los momentos difíciles, por sus consejos, valores y principios que han puesto en mí, por apoyarme a alcanzar cada meta que me propongo y ser el pilar fundamental en mi vida.

A mi esposo, Esteban Rivera porque a lo largo de este trayecto me ha demostrado su amor incondicional, su apoyo en todo momento, su comprensión y paciencia, por ser una persona especial en mi vida.

Finalmente a todos los que con su ejemplo y dedicación formaron la persona que ahora soy, con mucho amor para todos ustedes.

Glenda Calero Blandón.

Dedicatoria

Dedico este proyecto de Monografía a Dios, porque ha sido mi guía a lo largo de este camino, estando conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza porque sin el nada de esto hubiera sido posible.

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora. Marina Fernández, gracias por tus sabios consejos y por tu amor incondicional mamá. Ajax Morales, eres un padre ejemplar, te agradezco por todos tus sacrificios y por siempre, siempre estar para mí; seguimos adelante padre. Gracias. Los adoro.

A mis segundos padres, Francisco De Trinidad y Patricia Morales, quienes son muy especiales en mi vida, gracias por sus consejos y su apoyo incondicional, que les puedo decir, los amo mucho.

Finalmente, pero no menos importante, a mi esposo Abner Monje mi gran amor, por ser mi compañero inseparable de cada día, por su paciencia, su apoyo incondicional y su gran amor infinito. Te amo esposo.

A todos ustedes, con amor.

Kendys Morales Fernández.

Agradecimiento

A Dios nuestro padre celestial que siempre está con nosotros apoyándonos en cada momento.

Nuestro más grato agradecimiento a la dirección y área de docencia del Centro para la Investigación de Recursos Acuáticos (CIRA-UNAN), por facilitarnos las condiciones y equipos necesarios para la realización de nuestro trabajo.

A los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI) de la UNAN-Managua, por darnos el apoyo económico para financiar parte del análisis de nuestra investigación.

A Nuestro tutor Lcdo. Josseth Martin Díaz por brindarnos su apoyo incondicional, paciencia, tiempo y lo más importante su mano amiga. Gracias por habernos guiado en el desarrollo de este trabajo y estar con nosotras en la culminación del mismo.

A la Lcda. Gioconda Matus nuestra asesora y jefa del laboratorio de Contaminantes Orgánicos del CIRA-UNAN y a todo el personal que labora en este laboratorio por brindarnos su apoyo y herramientas necesarias en la realización de nuestra investigación.

Al Departamento de Química de la UNAN-Managua por jugar el papel principal en brindarnos de su tiempo, apoyo, conocimientos y excelentes valores transmitidos en el desarrollo de nuestra formación profesional.

Carta aval del tutor

En calidad de tutor de tesis presentada por las Bra. Glenda Michel Calero Blandón y Bra. Kendys Scarleth Morales Fernández, para optar al título de Licenciatura en Química Ambiental, una vez revisado el contenido del tema: **“Validación y Estimación de la Incertidumbre de una Metodología Analítica para Determinar la Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo en Agua, en el Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua, Septiembre 2016-Noviembre 2017”**. Doy fe que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a presentación y evaluación por parte del jurado examinador que sea designado por el departamento.

Dado en la ciudad de Managua, a los 29 días del mes de noviembre de 2017.

Atentamente

Lcdo. Josseth Mhartín Díaz Domínguez
Especialista en análisis de laboratorios
Laboratorio de Contaminantes Orgánicos
CIRA/UNAN-Managua

Resumen

El presente trabajo describe la validación y estimación de la incertidumbre por medio del método analítico 8015D de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA), para compuestos orgánicos no halogenados (Rango Orgánico de Diésel), aplicando la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), para determinar la Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua.

Se evaluaron los parámetros de validación del método analítico: Exactitud, Precisión, Linealidad, Selectividad/Especificidad, Sensibilidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, de acuerdo a la política establecida por la Oficina Nacional de Acreditación (ONA, 2012)

Al comparar los resultados obtenidos con los criterios de aceptación establecidos según la política de la Oficina Nacional de Acreditación, estos resultan ser satisfactorios, es decir el método presenta un buen desempeño en el análisis de la fracción del Rango Orgánico de Diésel (DRO). Para la fracción de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's) los resultados obtenidos son lo contrario porque no cumple con los criterios de aceptación establecidos, esto se debe al material de referencia (Solución de Combustible Diésel) utilizado, ya que se comprobó que no era el adecuado para el desempeño y satisfactoriedad de esta fracción.

En la estimación de la incertidumbre de los resultados en las muestras fortificadas con el material de referencia, se determinaron valores entre 1,64 y 1,84 $\mu\text{g/mL}$, utilizando un factor de cobertura de 2, con una confiabilidad del 95%. Así mismo se determinó que la fuente que aporta mayor incertidumbre a los resultados es el factor de respuesta (R_f), que es directamente proporcional al estándar de cuantificación.

Palabras claves: Agua, Cromatografía, DRO, Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo, PAH's y Validación.

Índice

<i>Dedicatoria</i>	<i>iii</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>iv</i>
<i>Agradecimiento</i>	<i>v</i>
<i>Carta aval del tutor</i>	<i>vi</i>
<i>Resumen</i>	<i>vii</i>
CAPITULO I	1
1.1. Introducción	2
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos de investigación	5
CAPITULO II	6
2.1. Marco Referencial	7
2.1.1. Composición química del petróleo	7
2.1.2. Clasificación de los Hidrocarburos	8
2.1.2.1. Hidrocarburos saturados	8
2.1.2.2. Hidrocarburos insaturados	9
2.1.2.3. Hidrocarburos aromáticos	9
2.1.2.4. Hidrocarburos con Heteroátomos	10
2.1.3. Toxicidad de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua	10
2.1.4. Análisis de la fracción media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua	12
2.1.5. Extracción líquido-líquido	12
2.1.6. Separación por cromatografía de gases	14
2.1.6.1. Detector de Ionización de Llama (FID)	15
2.1.6.2. Componentes de la cromatografía de Gases (CG)	16
2.1.7. Aseguramiento de la calidad	17
2.1.8. Errores en las Mediciones Analíticas	18
2.1.8.1. Errores Determinados (Sistemáticos)	18
2.1.8.2. Errores Indeterminados (Aleatorios)	19

2.1.9.	Validación de Métodos Analíticos _____	20
2.1.9.1.	Herramientas validación _____	21
2.1.9.1.1.	Blancos _____	21
2.1.9.1.4.	Estadística _____	22
2.1.10.	Parámetros a determinar en la validación del método analítico _____	22
2.1.10.1.	Exactitud _____	22
2.1.10.2.	Veracidad _____	23
2.1.10.2.1.	Recuperación _____	24
2.1.10.3.	Precisión _____	24
2.1.10.4.	Linealidad del método _____	25
2.1.10.5.	Linealidad del Sistema _____	25
2.1.10.6.	Límites de detección _____	25
2.1.10.7.	Límite de cuantificación (LQ) _____	25
2.1.10.8.	Sensibilidad _____	25
2.1.10.9.	Rango _____	26
2.1.10.10.	Selectividad/Especificidad _____	26
2.1.11.	Evaluación de la incertidumbre de los resultados _____	26
2.1.11.1.	Tipos de incertidumbres _____	27
2.1.11.1.1.	Incertidumbre Tipo A _____	27
2.1.11.1.2.	Incertidumbre Tipo B _____	27
2.1.11.1.3.	Incertidumbre estándar combinada _____	29
2.1.11.1.4.	Incertidumbre expandida _____	29
2.1.12.	Política para la validación de métodos de laboratorios de ensayos y calibración según la política de la Oficina Nacional de Acreditación _____	29
2.2.	Antecedentes _____	31
2.3.	Hipótesis. _____	32
	CAPITULO III _____	33
3.1.	Diseño Metodológico _____	34
3.1.1.	Descripción del ámbito de estudio _____	34
3.1.2.	Tipo de estudio _____	34
3.1.3.	Población y Muestra _____	34
3.1.4.	Operacionalización de Variables _____	35

3.1.5.	Material y Método	36
3.1.5.1.	Materiales para recolectar información	36
3.1.5.2.	Materiales para procesar la información	36
3.1.5.3.	Equipos, reactivos y materiales de laboratorio	36
3.1.5.4.	Método	39
3.2.	Procedimiento Analítico	40
3.2.1.	Limpieza y Calibración del Material Volumétrico	40
3.2.1.1.	Procedimiento utilizado para la Calibración de matraz	41
3.2.1.2.	Procedimiento utilizado para la calibración de pipetas	41
3.2.2.	Preparación de soluciones	42
3.2.3.	Curva de calibración	43
3.2.4.	Proceso de extracción de muestra	44
3.2.4.1.	Etaapa de Limpieza y Fraccionamiento	45
3.2.4.2.	Inyección de muestras en el Cromatógrafo	46
3.3.	Cuantificación de las concentraciones de la fracción media de HTP	46
3.4.	Evaluación de los parámetros de validación	47
3.4.1.	Exactitud	48
3.4.2.	Precisión	49
3.4.3.	Sensibilidad	50
3.4.4.	Selectividad/Especificidad	50
3.4.5.	Límite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC)	51
3.4.6.	Linealidad del método y rango	52
3.4.7.	Linealidad del sistema	53
3.4.8.	Límites de confianza para la curva de calibración para la fracción media de HTP	54
3.5.	Incertidumbre de los resultados	55
3.5.1.	Incertidumbre en la calibración del material Volumétrico	55
3.5.1.1.	Identificación y organización de las fuentes de incertidumbre	57
3.5.1.2.	Coeficientes de sensibilidad de la incertidumbre del material volumétrico	59
3.5.2.	Incertidumbre expandida (U)	61
3.5.3.	Incertidumbre en la preparación de las soluciones	62
3.6.	Incertidumbre del método analítico	65
3.6.1.	Componentes de la incertidumbre	66

3.6.2.	Evaluación de la incertidumbre de los componentes _____	67
3.6.2.1.	Área de la muestra _____	67
3.6.2.2.	Volumen de aforo _____	67
3.6.2.3.	Factor de respuesta _____	67
3.6.2.4.	Volumen de la muestra _____	68
	CAPITULO IV _____	69
4.1.	Análisis y Discusión de los Resultados _____	70
4.2.	Cálculos del volumen en la calibración de la cristalería utilizada _____	70
4.2.1.	Estimación de la incertidumbre del material volumétrico _____	72
4.2.1.1.	Incertidumbre de las masas _____	72
4.2.1.1.1.	Incertidumbre de Mb _____	72
4.2.1.1.2.	Incertidumbre de Mc _____	73
4.2.1.2.	Incertidumbre en la densidad del hexano _____	73
4.2.1.3.	Incertidumbre de la temperatura _____	73
4.2.1.4.	Incertidumbre del coeficiente de expansión cúbico _____	73
4.2.1.5.	Incertidumbre de la densidad de las pesas de la balanza _____	73
4.2.1.6.	Determinación de los coeficientes de sensibilidad para la calibración del material volumétrico _____	74
4.3.	Preparación de soluciones, soluciones intermedias y soluciones trabajo _____	77
4.3.1.	Estimación de la incertidumbre en la preparación de las soluciones _____	78
4.3.1.1.	Incertidumbre de la solución intermedia _____	78
4.3.1.2.	Incertidumbre de la solución trabajo _____	80
4.3.1.3.	Incertidumbre del estándar de trabajo _____	81
4.4.	Estimación de la incertidumbre del método analítico _____	83
4.4.1.	Incertidumbre del área de la muestra _____	83
4.4.2.	Incertidumbre del factor de respuesta _____	85
4.4.3.	Incertidumbre de volumen de la Muestra _____	86
4.5.	Determinación de los parámetros de validación _____	88
4.5.1.	Exactitud _____	88
4.5.2.	Precisión _____	89
4.5.3.	Sensibilidad _____	91

4.5.4.	Límite de Detección (LD) y Limite de Cuantificación (LC)	91
4.5.5.	Linealidad del método y Rango	94
4.5.6.	Linealidad del sistema	96
<i>CAPITULO V</i>		<i>99</i>
5.1.	Conclusión	100
5.2.	Recomendaciones	101
5.3.	Referencias	102
<i>CAPITULO VI</i>		<i>105</i>
<i>Anexos</i>		<i>105</i>

Índice de tabla

Tabla 1 Rangos constituyentes de fracciones de HTP	8
Tabla 2 Operacionalización de Variables	35
Tabla 3 Materiales volumétricos (Vidrio clase A) con tolerancia del fabricante	37
Tabla 4 Otros materiales utilizados en el análisis	38
Tabla 5 Solventes utilizados en la extracción	39
Tabla 6 Estándares analíticos de alta pureza	39
Tabla 7 Concentraciones de las soluciones (curva de calibración DRO-PAH's)	44
Tabla 8 Ecuaciones de sumas de cuadrados y grados de libertad	49
Tabla 9 Ecuaciones con respecto al estadístico de prueba para la correlación, pendiente e intercepto	53
Tabla 10 Material volumétrico con su incertidumbre asociada	61
Tabla 11 Resultados de la calibración del matraz de aforo de 2,00 mL	71
Tabla 12 Concentraciones intermedia con sus incertidumbres asociadas	80
Tabla 13 Concentraciones de trabajo con sus incertidumbres asociadas	81
Tabla 14 Muestras fortificadas por el material de referencia (Solución de Combustible Diésel)	83
Tabla 15 Muestras fortificadas para la respuesta del sistema	84
Tabla 16 Concentraciones de muestras fortificadas con su incertidumbre expandida asociada	88
Tabla 17 Muestras fortificadas	89
Tabla 18 Suma de cuadrados y grados de libertad	90
Tabla 19 Tratamiento estadístico para la determinación de LD y LC del sistema (instrumento)	92
Tabla 20 Blanco matriz	93
Tabla 21 Tratamiento estadístico para el cálculo de r , r^2 , b , a , S_b y S_a	94

Tabla 22	<i>Prueba estadística de t-student para r, b y a</i>	95
Tabla 23	<i>Intervalo para la linealidad del sistema (instrumento)</i>	97

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Proceso de degradación del petróleo en el medio ambiente _____	11
<i>Figura 2.</i> Diagrama de análisis de la fracción media de los hidrocarburos totales de petróleo en agua _____	12
<i>Figura 3.</i> Embudo de separación (Laboratorio de Contaminantes Orgánicos CIRA/UNAN-Managua) _____	14
<i>Figura 4.</i> Detector de ionización de llama (FID) _____	16
<i>Figura 5.</i> Diagrama de las partes básicas de un Cromatógrafo de gases _____	17
<i>Figura 6</i> Diagrama de las fuentes de incertidumbre _____	57
<i>Figura 7.</i> Diagrama de causa y efecto _____	66



CAPITULO 1

1.1. Introducción

La fracción media de Hidrocarburos Totales de Petróleo (Rango Orgánico de Diésel) es una de las principales fuentes de contaminación del agua, se produce ya sea por liberación intencional o accidental en el desarrollo de actividades que involucran transporte, explotación, industria y comercio, convirtiéndose en una fuente de contaminación para el ecosistema.

El Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua (CIRA/UNAN-Managua), es uno de los centros de investigación, que cuenta con un sistema de gestión de la calidad basado en la Norma Técnica Nicaragüense NTN 0400105 (NTN, 2005), que les permite brindar resultados con calidad, confiables y pertinentes a la población en general para la toma de decisión, basado en el aporte de evidencias objetivas, esto conlleva a que los procedimientos para la realización de ensayos deben ser validados (ONA, 2012). También se debe asegurar que los resultados emitidos no den una información equivocada y esto se logra a través de la estimación de la incertidumbre.

El presente trabajo pretende dar respuesta a esta necesidad, basándose en el estudio de la eficiencia del método de compuestos orgánicos no halogenados (fracción media de HTP) utilizando cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) Método 8015D (EPA, 2003) y a la política establecida por la Oficina Nacional de Acreditación (ONA, 2012), estimando los parámetros de validación e incertidumbre de las medidas y resultado obtenidos del análisis.

1.2. Planteamiento del problema

En la actividad petrolera, el manejo diario de hidrocarburos, en algunos casos conlleva a la contaminación del agua cuando tanques de reserva, oleoductos y diversas instalaciones sufren pérdidas por fallas o descuidos, estos líquidos por el relieve de la topografía migran hacia cursos de agua, suelo, subsuelo y hacia aguas subterráneas, provocando un efecto de contaminación (Estrella, I., & Guevara, P., 2011).

Este tipo de contaminación produce un cambio en las características organolépticas del agua que induce al rechazo de los consumidores y su ingestión representa un riesgo para la salud; asimismo, el ecosistema puede sufrir afectaciones debidas al impacto negativo de estos contaminantes (Prieto, V., y Martínez, A., 1999).

Nicaragua ha sufrido serios problemas en diferentes sectores, sobre la contaminación ambiental debido a esto. Por estos casos se han establecidos en el país, parámetros reglamentarios y normativos, estos parámetros están regulados por el Instituto Nicaragüense de Energía (INE), quien coordina la instancia, formula y da seguimiento a los planes de producción e importación de hidrocarburos de los agentes económicos.

Es por esto que el CIRA/UNAN-Managua, está interesado en brindar resultados de calidad, confiables y pertinentes, sobre la contaminación ambiental por la fracción media de HTP, demostrando a través de evidencias objetivas la validez de sus resultados, ante la población en general para la toma de decisión y la ONA con fines de acreditación.

Ante esta problemática han surgido las siguientes preguntas de investigación:

¿Es adecuado el procedimiento de ensayo que utiliza el laboratorio de contaminantes orgánicos del CIRA/UNAN-Managua para la determinación de la fracción media de HTP en agua?

¿Los parámetros de selectividad/especificidad, sensibilidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud, precisión, linealidad o intervalo de trabajo y rango demuestran la validez de los resultados para la determinación de la fracción media de HTP en agua?

¿La incertidumbre de medición del método analítico para la determinación de la fracción media de HTP en agua, aseguran que los resultados emitidos no dan información equivocada?

1.3. Justificación

La determinación cuantitativa de los compuestos de origen del petróleo es muy importante en aguas naturales y residuales, por la disminución en el contenido de oxígeno en el agua, de la misma manera disminuye la tensión superficial, afectando a los ecosistemas y a la salud humana (Estrella, I., & Guevara, P., 2011).

Dada la necesidad que tienen las empresas industriales, privadas y comerciales de carácter público, de cumplir con la ley de vertidos establecido en el Decreto No. 21-2017 (Reglamento en el que se establecen las disposiciones para el vertido de aguas residuales, 2017), en el cual se establecen los valores límite máximos permisibles de parámetros provenientes de descargas de agua residuales, domésticas, industriales y agropecuarias. Por esta razón el laboratorio de contaminantes orgánicos del CIRA/UNAN Managua, ha implementado el método analítico de compuestos orgánicos no halogenados (Fracción Media de HTP) (EPA, 2003).

Para tal fin, debe validarse y estimarse la incertidumbre de la medición del método empleado para proveer al usuario resultados con un alto de nivel de confianza y credibilidad, lo cual se debe respaldar con documentos que hagan referencia al método de ensayo, a los equipos empleados, reactivos y otros aspectos que aseguren la confiabilidad de los resultados analíticos.

1.4. Objetivos de investigación

Objetivo general

Evaluar los parámetros de validación y la incertidumbre de los resultados obtenidos utilizando la metodología analítica para la determinación de la Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua que permitan la acreditación del ensayo.

Objetivos específicos

1. Establecer los parámetros de selectividad/especificidad, sensibilidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud, precisión, linealidad o intervalo de trabajo y rango del procedimiento de ensayo para la determinación de la fracción media de HTP en agua.
2. Estimar la incertidumbre de la medición del método analítico para la determinación de la fracción media de HTP en agua.
3. Presentar los resultados del trabajo de grado como base para realizar una divulgación científica.



CAPITULO II

2.1. Marco Referencial

2.1.1. Composición química del petróleo

El petróleo es un líquido oleoso, inflamable cuyo color varía entre pardo oscuro y negro con reflejos verdosos. Su nombre se deriva del latín *Petra* que se significa Roca y *Oleoum* que se significa Aceite, es decir, *Aceite de Piedra* (Ron, K., 2012).

Su composición varía de acuerdo al tipo de yacimiento de origen, por lo que resulta casi imposible encontrar dos tipos idénticos de petróleo. Está formado por una mezcla compleja de hidrocarburos (compuestos de carbono e hidrógeno), hidrocarburos heteroatómicos (compuestos con átomos de azufre, nitrógeno u oxígeno) y cantidades relativamente pequeñas de metales como vanadio, níquel, cromo y plomo (Ron, K., 2012).

Como se ha descrito anteriormente, la composición del petróleo y sus productos derivados es compleja. La cantidad de hidrocarburos que se encuentran en él y en sus derivados dificultan su medición individual, sin embargo, resulta mucho más práctica la medición total de hidrocarburos presentes en una muestra particular, como hidrocarburos totales de petróleo (HTP) (Ron, K., 2012).

Los hidrocarburos que forman parte de los HTP son compuestos inflamables, con densidades variables y diferentes puntos de ebullición, propiedades que influyen en su comportamiento sobre el agua, suelo o aire. El grupo de los HTP lo conforman compuestos de carbono e hidrógeno en un rango C5 a C36, abarcando productos derivados como gasolina, nafta, jet fuel, keroseno, diésel, etc. (Ron, K., 2012). Para un mejor entendimiento de su comportamiento en aguas o suelos, se les divide en las fracciones que se observan en la *Tabla 1*.

Tabla 1

Rangos constituyentes de Hidrocarburos Totales de Petróleo

Tipos de fracción	Constituyente	Puntos de ebullición
HTP-GRO (HTP en Rango Orgánico de gasolina)	C ₅ -C ₁₀	60°C-170 °C
HTP-DRO (HTP en Rango Orgánico de Diésel)	C ₁₀ -C ₂₅	170°C-430 °C
HTP-ORO (HTP en Rango de Aceites y Lubricantes)	C ₂₅ -C ₃₆	---

(Ron, K., 2012)

Así se define a estas fracciones como la suma de los hidrocarburos que están dentro de los tiempos de retención de C₅ a C₁₀ (n-Pentano a n-Decano), C₁₀ a C₂₅ (n-Decano a n-Pentacosano) y C₂₅ a C₃₆ (n-Pentacosano a n-Hexatriacontano) para GRO, DRO y ORO respectivamente.

Estas fracciones agrupan compuestos con propiedades químicas similares entre sí, estas varían de acuerdo a la estructura carbonada formadora de los compuestos presentes en cada fracción. Las principales propiedades que agrupan a estos compuestos son la densidad, punto de ebullición, presión de vapor, solubilidad y polaridad (Ron, K., 2012)

2.1.2. Clasificación de los Hidrocarburos

Los hidrocarburos se pueden agrupar en compuestos saturados, insaturados y aromáticos; considerando estas últimas como un tipo de hidrocarburos insaturados.

2.1.2.1. Hidrocarburos saturados

Constituyen los componentes principales del petróleo y de sus productos. Están formados por enlaces simples entre C - C, todos saturados con átomos de hidrógeno. Este tipo de compuestos pueden ser arreglados en algunas configuraciones:

- Alifáticos: hidrocarburos de cadena lineal o ramificada con la fórmula general: C_nH_{2n+2} . Se denominan alcanos o isoalcanos, mientras que en la industria petrolera se los conoce como parafinas o isoparafinas respectivamente.
- Alicíclicos: hidrocarburos cíclicos con la fórmula general: C_nH_{2n} . Contienen en su estructura uno o más anillos, e incluso con ramificaciones. Se denominan cicloalcanos, cicloparafinas o naftenos dentro de la industria petrolera.

2.1.2.2. Hidrocarburos insaturados

Esta clase de compuestos tiene al menos dos átomos de carbono unidos por un doble o triple enlace: $C = C$, $C \equiv C$. Generalmente no se encuentran en el petróleo, sino que se forman mediante procesos de cracking del mismo. De acuerdo al tipo de enlaces que presenta la molécula, se tienen:

- Alquenos u olefinas: hidrocarburos de cadena lineal, ramificada o cíclica que contienen en su estructura al menos un doble enlace $C = C$. Su fórmula general es: C_nH_{2n} .
- Alquinos o acetilenos: hidrocarburos de cadena lineal o ramificada que contienen en su estructura al menos un triple enlace $C \equiv C$. Su fórmula general es: C_nH_{2n-2} (Ron, K., 2012)

2.1.2.3. Hidrocarburos aromáticos

Hidrocarburos cuya estructura se basa en la molécula de benceno. Este está compuesto por seis átomos de carbono formando un anillo, y cada átomo de carbono está unido por un átomo de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno pueden ser sustituidos por hidrocarburos lineales, ramificados o cíclicos (alquilbencenos). También se pueden fusionar uno o más anillos aromáticos (hidrocarburos aromáticos policíclicos) (Ron, K., 2012).

2.1.2.4. Hidrocarburos con Heteroátomos

Dentro de este grupo se encuentran constituyentes de petróleo que a más de carbono e hidrógeno poseen en su estructura átomos de azufre, oxígeno, nitrógeno, y pequeñas cantidades de metales (Ron, K., 2012).

2.1.3. Toxicidad de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua

Los hidrocarburos de petróleo llegan al medio ambiente principalmente mediante derrames de petróleo crudo o derivados, generados por el hombre desde diferentes fuentes: accidentes durante su transporte, fugas en los equipos de perforación o refinación, etc. Cuando el medio afectado es el agua, los efectos son altamente dañinos para el fitoplacton y los animales acuáticos.

Cuando se derrama petróleo en un medio acuático, la mancha de aceite se extiende en una superficie cada vez mayor hasta llegar a formar una capa muy extensa, de un espesor muy delgado. Se estima que en el transcurso de 1½ horas, 1 m³ de petróleo puede llegar a formar una mancha de 100 m de diámetro y 0,1 mm de espesor. (Ron, K., 2012).

Los efectos del petróleo sobre los ecosistemas acuáticos dependen de varios factores, entre los que se encuentran están: tipo de petróleo (crudo o refinado), cantidad, época del año, condiciones atmosféricas y temperatura del agua. Cuando el petróleo es liberado al medio ambiente inmediatamente sufre una variedad de cambios físicos, químicos y biológicos. De acuerdo a esto el petróleo derramado experimenta lo que se conoce como proceso de degradación, pudiendo tomar varios caminos dentro de un medio acuático, como se observa en la *figura 1*.

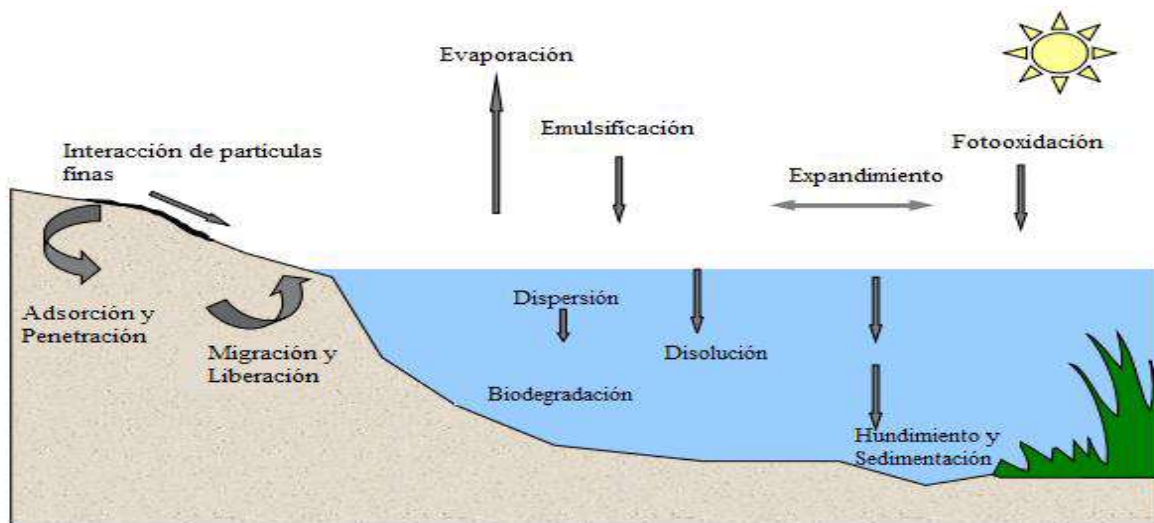


Figura 1. Proceso de degradación del petróleo en el medio ambiente

(Ron, K., 2012)

Estos fenómenos se ven afectados por propiedades físicas del petróleo que incluyen la densidad, viscosidad y solubilidad. Es así que hidrocarburos de bajo peso molecular se volatilizan en un periodo de dos hasta siete días, dependiendo de la temperatura del agua. Mientras que hidrocarburos de mayor densidad no logran volatilizarse y tienden a formar una capa impermeable sobre el agua. Además los componentes pesados del petróleo como los de asfalto o alquitrán se hunden y sedimentan en el fondo, ocasionando la muerte de animales o plantas que habitan en las profundidades.

Los hidrocarburos aromáticos, pueden disolverse en agua y quedar biodisponibles para los seres vivos con mayor facilidad. Por otra parte, la fracción no soluble puede formar emulsiones bastante estables, que mediante foto-oxidación pueden generar metabolitos mucho tóxicos para la biota (Ron, K., 2012).

La forma en que el petróleo derramado afecta a la fauna y flora es variada y compleja; afecta a todo el ecosistema e incluso puede llegar al hombre a través de la cadena alimenticia (plantas - animales herbívoros - animales carnívoros - hombre).

2.1.4. Análisis de la fracción media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua

Cualquier proceso utilizado para identificar, analizar y resolver un problema determinado cuenta con una serie de etapas las cuales tienen como objetivo dar respuesta a dicho problema. La siguiente figura describe el proceso para analizar la fracción media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua.

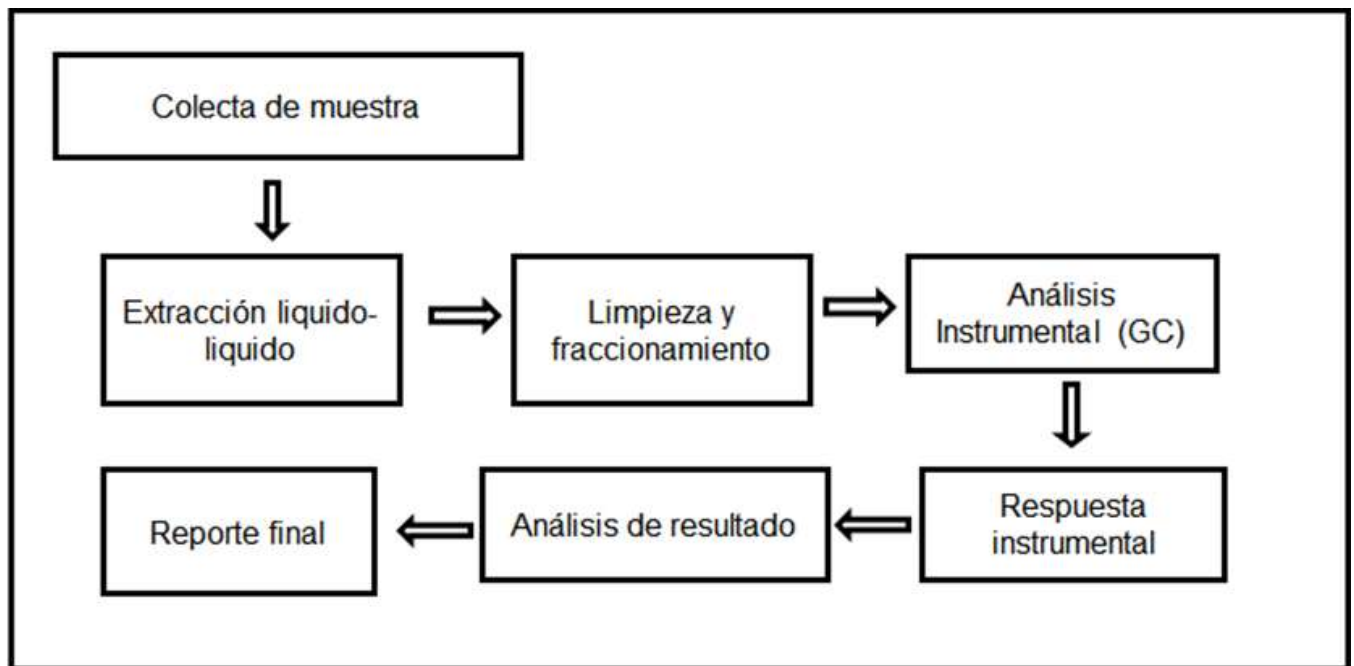


Figura 2. Diagrama de análisis de la fracción media de los hidrocarburos totales de petróleo en agua

2.1.5. Extracción líquido-líquido

Se conoce como extracción con disolventes, consiste en la separación de los componentes de una solución líquida por contacto con otro líquido parcialmente insoluble. Si las sustancias que componen la solución original se distribuyen de manera distinta entre las dos fases líquidas, se puede lograr cierto grado de separación, que puede incrementarse mediante el uso de contactos múltiples (Cortes, R., s.f).

Cabe distinguir tres tipos generales de técnicas de extracción líquido-líquido: simple, continua y contracorriente.

- **Extracción Simple**

Esta técnica consiste en realizar un único equilibrio entre ambas fases. Se utiliza cuando el valor de la relación de distribución del componente a separar es elevado mientras que el de los restantes es próximo a cero, de forma que el factor de separación tiene también un valor alto.

Para realizar la extracción simple se utiliza un embudo de decantación que es un recipiente generalmente de vidrio. Se cierra al exterior mediante un tapón de vidrio o teflón situado en su parte superior, y con una llave, también de vidrio o teflón en la inferior. Su volumen debe ser dos o tres veces superior a la suma de los volúmenes de ambas fases para que se pueda realizar adecuadamente la agitación del sistema (Válcarcel, M. y Gómez, A., 1998).

- **Extracción Repetitiva**

Cuando la relación de distribución no tiene un valor elevado, de forma que mediante la extracción simple no se consigue la separación deseada, es necesario recurrir a la extracción repetitiva que consiste en poner en contacto repetidas veces la fase que contiene la mezcla a separar, generalmente la acuosa, con porciones frescas de la segunda fase, alcanzándose en cada caso el equilibrio (Válcarcel, M. y Gómez, A., 1998).

- **Extracción por Etapas**

Consiste en realizar de forma secuencial un número determinado de extracciones simples retirando después de cada equilibrio la fase orgánica y poniendo en contacto la fase acuosa con un volumen nuevo de fase orgánica. Finalmente se reúnen todas las porciones de disolvente orgánico que contiene el soluto separado (Válcarcel, M. y Gómez, A., 1998).



Figura 3. Embudo de separación (Laboratorio de Contaminantes Orgánicos CIRA/UNAN-Managua)

2.1.6. Separación por cromatografía de gases

La cromatografía es una técnica utilizada para separar los componentes de una sustancia. Como su nombre lo indica, utiliza un gas de arrastre como fase móvil, entre ellos Helio, Argón y nitrógeno, junto con una fase estacionaria en el interior de una columna empacada o tubular abierta (capilar). La separación se hace por partición de muestras gaseosas entre un gas de arrastre y la fase estacionaria.

La muestra debe estar ya en la fase gaseosa (o transformada en la fase gaseosa por calentamiento), así que se puede pasar a la corriente del gas de arrastre de gran pureza, químicamente inerte, como nitrógeno, dióxido de carbono, helio o argón, aunque la elección suele estar determinada por la clase de detector que se usa.

La cromatografía de gases tiene una amplia aplicación en la industria, se enfoca principalmente en evaluar la pureza de los reactantes y productos de reacción o bien a monitorear la secuencia de la reacción, para los fabricantes de reactivos químicos su aplicación para la determinación de la pureza es lo más importante (Montoya, S., & Páez, C., 2012)

En la investigación es un auxiliar indispensable para diversas técnicas de evaluación, entre las principales están los estudios cinéticos, análisis de adsorción a temperatura programada,

determinación de áreas específicas por adsorción de gas y determinación de isothermas de adsorción.

En el campo también pueden ser aplicados, principalmente en estudios de contaminantes del agua: plaguicidas en aguas de lagos, lagunas, ríos; desechos industriales descargados en ríos o lagunas, en cultivos. En la industria del petróleo juega una función primordial, por medio de la cromatografía se pueden analizar los constituyentes de las gasolinas, las mezclas de gases de refinería, gases de combustión, entre otros. Las aplicaciones de la cromatografía son múltiples y la convierten en la técnica de análisis más poderosa que existe, su utilización requiere principalmente de constancia y entusiasmo (Montoya, S., & Páez, C., 2012).

Los tipos de Detectores utilizados en cromatografía de gases son: Detector de Ionización de Llama (FID), Detector de Captura de Electrones (ECD), Detector de Fotoionización (PID), Detector de Ionización de Helio de Descarga Pulsada (PHID), Detector Fotométrico de Llama (FPD), Detector Hall de Conductividad Electrónica (ELCD), Detector de Nitrógeno-Fosforo (NPD). En este estudio se utilizó el Detector de Ionización de Llama.

2.1.6.1. Detector de Ionización de Llama (FID)

El detector de ionización de llama es el que más se utiliza y por lo general uno de los que más se aplican en cromatografía de gases. El efluente de la columna se dirige a una pequeña llama de hidrogeno y aire. La mayoría de los compuestos orgánicos producen iones y electrones cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrogeno-aire.

El FID es un detector de muy alta sensibilidad apto para hidrocarburos pues permite detectar los iones de carbono que se forman durante la combustión a alta temperatura (Montoya, S., & Páez, C., 2012).

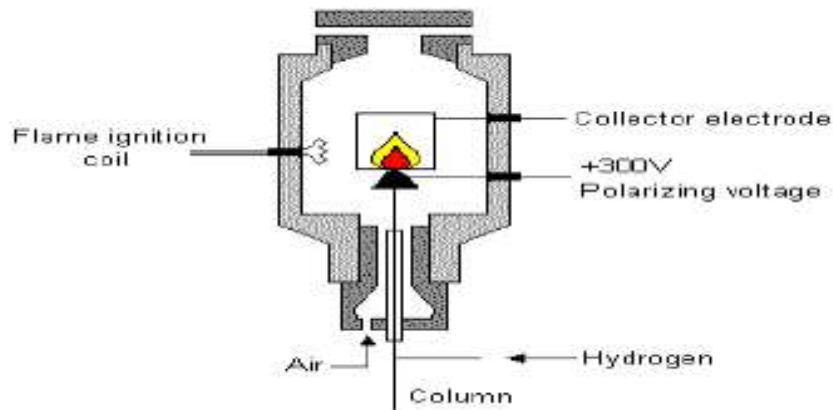


Figura 4. Detector de ionización de llama (FID)

(Ron, K., 2012)

2.1.6.2. Componentes de la cromatografía de Gases (CG)

La figura 5 muestra las partes básicas de un equipo de CG. El gas portador es almacenado a alta presión en un generador de hidrógeno apropiado, conectado al equipo mediante un regulador de presión. La muestra que contiene los hidrocarburos totales de petróleo es transportada al sistema cromatográfico a través de una jeringa de vidrio la que se introduce en el puerto de inyección (inyector). El inyector está a una temperatura superior a la del punto de ebullición del disolvente de la muestra y normalmente, también superior al de los analitos; y es ahí donde se produce la necesaria volatilización.

La muestra se diluye con gas portador y solo una fracción de la misma entra en la columna capilar. Esta es la misión del divisor de muestra. En la columna se realiza la separación. Tras atravesar la columna, los analitos llegan a los detectores, donde se produce una señal eléctrica que es amplificada y enviada a un sistema de almacenamiento de datos para ser analizada (Montoya, S., & Páez, C., 2012).

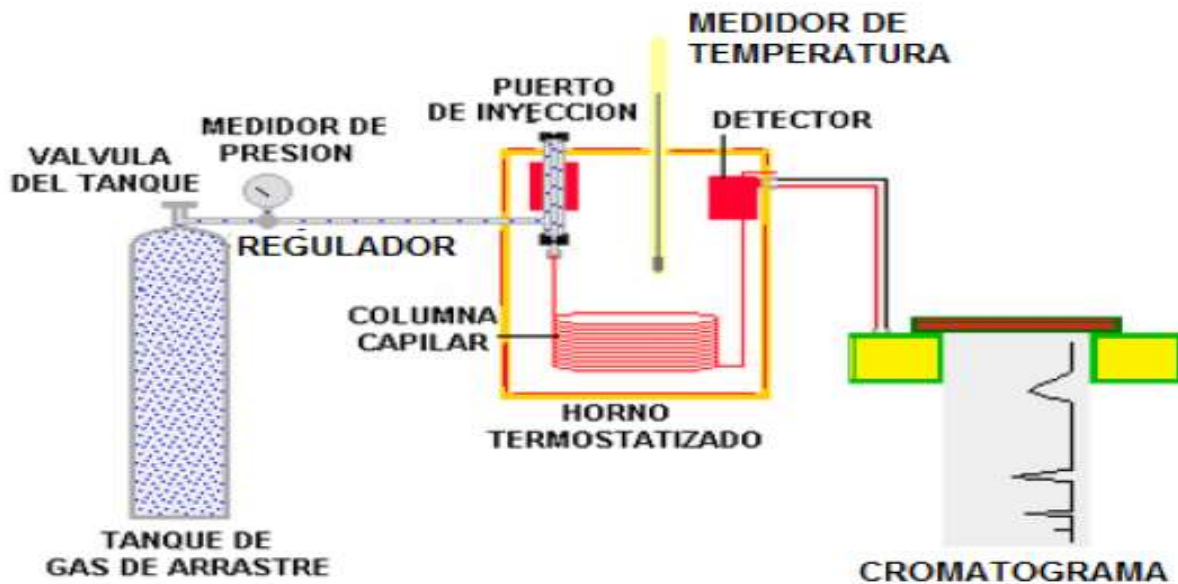


Figura 5. Diagrama de las partes básicas de un Cromatógrafo de gases

(Montoya, S., & Páez, C., 2012)

2.1.7. Aseguramiento de la calidad

El aseguramiento de la calidad analítica forma parte imprescindible de la administración de laboratorios, que busca demostrar y evaluar de manera transparente, objetiva y documentada la validez de los procedimientos utilizados en el laboratorio para generar datos confiables, mediante la participación de un tercero.

El aseguramiento de calidad presupone la existencia de un sistema de control de calidad (Quality Control) de las mediciones, de un sistema de evaluación de la calidad (Quality Assessment) y de un sistema de documentación que proporcione evidencia objetiva de su existencia. La ausencia de cualquiera de estos componentes compromete la validez de los resultados analíticos (Rodríguez, G., y Blanco, R., 2001).

La norma ISO/IEC 17025 en su versión 2005 dice en el requisito 5.9 “aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y calibración” que el laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad apropiados para el tipo y volumen de trabajo del laboratorio, para realizar

el seguimiento de la *VALIDEZ* de los ensayos y calibraciones llevados a cabo, registrarlos con el objetivo de detectar tendencias, y en la medida de lo posible aplicar técnicas estadísticas, para la revisión de resultados y puede incluir los elementos siguientes:

- Uso regular de materiales de referencia certificados (MRC), una matriz natural certificada lo más similar posible a las muestras de interés, o secundarios Material de Referencia (MR) utilizado generalmente cuando se requiere demostrar trazabilidad.
- Participación en comparaciones inter-laboratorio o ensayos de aptitud.
- Repetición de ensayos o calibraciones o de la calibración utilizando el mismo método o métodos diferentes.
- Repetición del ensayo o de la calibración de los objetos retenidos.
- Correlación de resultados para diferentes características de un instrumento (Qintero, C., 2013).

2.1.8. Errores en las Mediciones Analíticas

Todo resultado contendrá algo de error, independientemente de lo cuidadosa que haya sido la medición. Así mismo los métodos no apropiados de recolección y conservación de las especificaciones para muestras analíticas, pueden introducir errores en los resultados analíticos.

Para controlar estos errores, el laboratorio debe establecer un sistema de calidad sobre la base de buenas prácticas de laboratorio y los procedimientos de control interno, lo cual debe reforzarse con un control externo que se manifiesta en la participación, en estudios inter-laboratorios, donde se puede evaluar la competencia técnica de cada laboratorio. Los errores se pueden clasificar según su origen (Séamus, P., y Higson, J., 2007).

2.1.8.1. Errores Determinados (Sistemáticos)

Los errores sistemáticos hacen que todos los datos se desplacen en una sola dirección. Estos errores tienen, con frecuencia, una magnitud muy parecida. Este comportamiento se debe a

que se presenta el mismo tipo de error cada vez que se hace una medición (Séamus, P., y Higson, J., 2007).

Hay tres fuentes principales de errores determinados, que son:

1. Errores Instrumentales
2. Errores de Metodología
3. Errores Personales

Cada vez que se realiza una réplica, el error determinado siempre será alto o bajo. Los errores sistemáticos no se incluyen en las estimaciones de la incertidumbre, pero se establecen empleando materiales de referencia como es habitual y así se corrigen o eliminan (Miller, J., y Miller, J., 2002)

2.1.8.2. Errores Indeterminados (Aleatorios)

Los errores indeterminados o aleatorios surgen debido a variaciones pequeñas e imprescindible, es decir no tienen causa concreta, debido a esto no puede asignarse su presencia a una variable determinada, la fuente de error puede deberse a muchos factores, como error humano, fluctuaciones de temperatura o pequeñas diferencias en las cantidades de reactivos usados (Séamus, P., y Higson, J., 2007)

Sin embargo para revelar la presencia de errores aleatorios en los experimentos químicos es necesario habitualmente realizar medidas repetidas, para analizar el grado de variabilidad (o dispersión), entre n mediciones realizadas en un experimento, conocida como la media aritmética que es la suma de todas las medidas dividida por el número de medidas.

La media \bar{x} , de n mediciones viene dada por: $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Otra medida más útil que utiliza todos los valores, es la desviación estándar experimental, de una serie de n mediciones de la misma magnitud a medir viene dada: $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

En el cual x_i es el resultado de la i -ésima medición \bar{x} es la media aritmética de los n resultados considerados. Los límites de confianza de la media viene dado por: $\bar{x} \pm t_{n-1} \cdot s/\sqrt{n}$

2.1.9. Validación de Métodos Analíticos

Validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Inherente a esto está la necesidad de evaluar el desempeño del método (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. Es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

Para el desarrollo de las pruebas de validación, los analistas a cargo deberán conocer el procedimiento de método de ensayo y el número de ensayos o mediciones a realizar de acuerdo a lo establecido en el plan de validación (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

El personal responsable de realizar los análisis, debe de encontrarse debidamente calificado y así mismo los equipos asociados al método deberán encontrarse calibrados o controlados antes de su uso. En general, se establece que el laboratorio debe validar:

1. Métodos no normalizados: corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
2. Método normalizado: con una modificación significativa.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados

de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines aceptables (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una Validación Prospectiva, generando a través de análisis datos experimentales.

Los ensayos o mediciones realizadas serán con el fin de poder realizar las siguientes pruebas de parámetros de validación: Selectividad/Especificidad, Linealidad, Sensibilidad, Límites, Exactitud y Precisión. El analista o responsable de la validación deberá con los resultados obtenidos de cada prueba realizar los cálculos matemáticos, comparativos y/o estadísticos correspondientes a cada ensayo para lo cual podrá utilizar para ese fin un software estadístico, calculadora o una planilla de cálculo (ejemplo: Excel) (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

2.1.9.1. Herramientas validación

2.1.9.1.1. Blancos

El uso de diversos tipos de blancos permite evaluar cuánta señal de medida es atribuible al analito y cuánta a otras causas. Varios tipos de blanco están disponibles para el analista:

- Blancos de reactivos: Los reactivos utilizados durante el proceso analítico (incluyendo disolventes utilizados para extracción o disolución) se analizan para determinar si contribuyen a la señal de la medida.
- Blancos de muestra: Se trata de Muestras matriz sin presencia de analito, por ejemplo, muestra de orina humana sin fármaco específico, o una muestra de carne sin residuo de hormonas. Los blancos de muestra pueden ser difíciles de obtener, pero son necesarios para tener una estimación más real de las interferencias que pueden aparecer en un análisis de muestras de rutina (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

2.1.9.1.2. Soluciones/ muestras fortificadas

Son materiales o soluciones en los que el analito(s) ha sido adicionado a valores conocidos. Debe ponerse atención en los valores de concentración de modo que la adición no supere el intervalo de trabajo del método (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

2.1.9.1.3. Patrones de medida

Hay que distinguir entre material de referencia (MR) y material de referencia certificado (MRC), ya que su uso en el proceso de validación es diferente. Los MR pueden ser cualquier material empleado como valor de referencia, ya sean reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros dispositivos. La propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC.

La caracterización del parámetro de interés en un MRC se controla de manera más rigurosa que un MR, y el valor caracterizado se certifica con un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y en el que se declara su incertidumbre (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

2.1.9.1.4. Estadística

Las técnicas estadísticas son esenciales para agrupar los datos obtenidos y realizar un análisis objetivo de las diferencias entre conjuntos de datos (pruebas de significación). Los analistas deben familiarizarse con los elementos básicos de la teoría estadística como ayuda para la evaluación de la precisión, sesgo, rango lineal, límite de detección y cuantificación (LD y LQ) e incertidumbre de medida (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

2.1.10. Parámetros a determinar en la validación del método analítico

2.1.10.1. Exactitud

La 'exactitud' de medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016). Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la veracidad y el porcentaje de recobro (ONA, 2012).

2.1.10.2. Veracidad

‘Veracidad’ de medición es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, podemos realizar una evaluación práctica de la veracidad. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de ‘sesgo’ (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

Se dispone de dos técnicas básicas:

- Verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado.
- Comparación con otro método caracterizado.

Para verificar la veracidad utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia. Es recomendable que el material de referencia sea un material certificado de matriz natural, muy semejante a la muestra de interés. Claramente la disponibilidad de éstos materiales es limitada (ONA, 2012).

Los materiales de referencia para una validación pueden ser:

- a) Preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia con pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuada.
- b) Materiales típicos bien caracterizados, de estabilidad verificada internamente
- c) Conservados para control de calidad interno (ONA, 2012).

Sesgo

Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados (\bar{x}) del método candidato con un valor de referencia adecuado (x_o).

Existen tres enfoques generales:

- A) Análisis de materiales de referencia.
- B) Experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas.
- C) Comparación con resultados obtenidos mediante otro método (Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores, 2016).

Los materiales de referencia para una validación pueden ser:

- a) Preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia o con materiales de referencia con pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuada.
- b) Materiales típicos bien caracterizados, estabilidad verificada internamente y conservados para control de calidad interno (CENAM , 2005).

2.1.10.2.1. Recuperación

Se expresa como la cantidad adicionada de un analito a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis y que se pretende sea determinada efectivamente por el método (ONA, 2012).

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad de analito existente en la muestra original. Por lo cual la recuperación esta intrínsecamente relacionada a la características de la matriz de la muestra (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

2.1.10.3. Precisión

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas (ONA, 2012).

Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse (CENAM , 2005).

La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado.

Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de

precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo) (CENAM , 2005).

2.1.10.4. Linealidad del método

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra del laboratorio (Instituto de salud pública de Chile, 2010).

2.1.10.5. Linealidad del Sistema

La linealidad del sistema es básicamente la capacidad del equipo de trabajo de dar respuestas instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que es inyectado en el mismo (Guerrero, M., & Herrera, J., 2014)

2.1.10.6. Límites de detección

El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable o la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba (CENAM , 2005).

2.1.10.7. Límite de cuantificación (LQ)

Es la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba. Los límites de cuantificación son características de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición química para 'cuantificar' adecuadamente un analito (CENAM , 2005).

2.1.10.8. Sensibilidad

Es el cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo; el estímulo puede ser por ejemplo, la cantidad del mensurando presente. La sensibilidad puede depender del valor del estímulo, aunque esta definición se aplica

claramente a un instrumento de medición, también puede aplicarse al método analítico como un todo, tomando en cuenta otros factores tales como el efecto de los niveles de concentración (CENAM , 2005).

2.1.10.9. Rango

Se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método. (Validación de métodos analíticos (ONA, 2012).

2.1.10.10. Selectividad/Especificidad

Es la capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas (CENAM , 2005).

2.1.11. Evaluación de la incertidumbre de los resultados

Incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando

El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo dado de ella), o la mitad de un intervalo de confianza. La incertidumbre de la medición comprende en general muchos componentes. Algunos de estos componentes pueden evaluarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por medio de desviaciones estándar experimentales (CENAM , 2005).

Como fuentes de incertidumbre están:

- Extracción incompleta del objeto mensurando.
- Incertidumbre de pesas, equipo volumétrico.
- Resolución instrumental o discriminación del umbral.
- Valores asignados a patrones de medida y a materiales de referencia.
- Incertidumbre de los patrones e instrumentos calibrados.
- Aproximaciones y suposiciones usadas en el procedimiento y la medición.

- Factores ambientales, tales como variación de la temperatura, humedad relativa.

2.1.11.1. Tipos de incertidumbres

2.1.11.1.1. Incertidumbre Tipo A

Son las que se pueden determinar exclusivamente a partir del análisis estadístico de una serie de observaciones individuales.

En vista que esta incertidumbre (Tipo A) son basadas en el análisis de las observaciones, se puede evaluar llevando a cabo un número de mediciones independientes que consisten en poner a punto el sistema de medición y repetir el ciclo tantas veces como se requiera, se anotan los resultados y se calcula la media aritmética y la desviación estándar de la media (Chacon, J., 2004).

2.1.11.1.2. Incertidumbre Tipo B

La Incertidumbre tipo B puede ser asociada con efectos sistemáticos o con efectos aleatorios. En el caso de obtener un dato de entrada que no ha sido derivado durante el proceso de medición, de observaciones repetidas se evalúa a partir del juicio científico basado en toda la información disponible sobre la posible variabilidad de ese dato.

El uso adecuado de la información disponible, es una habilidad que está basada en la experiencia y el conocimiento general, esta información puede incluir:

- Especificaciones de los fabricantes.
- Datos obtenidos de los certificados de calibración y otros tipos de certificados.
- Incertidumbres asignadas a datos de referencia tomados de manuales.
- Datos de mediciones anteriores.
- Experiencia sobre el conocimiento general de las características, el comportamiento y las propiedades de los materiales e instrumentos relevantes (Chacon, J., 2004)

Distribución Normal

Si la estimación de x_i (tolerancia) se toma de la especificación del fabricante, de un certificado de calibración, manual u otra fuente y su incertidumbre asignada se establece como un múltiplo particular de una desviación estándar, la incertidumbre estándar $u(x_i)$ es simplemente el valor asignado dividido por el multiplicador y la varianza estimada $u^2(x_i)$ es el cuadrado de dicho cociente (Chacon, J., 2004).

Distribución rectangular simétrica

En algunos casos puede que sea posible estimar solo los límites (superior e inferior) para x_i , en particular para establecer que el valor de x_i este dentro del intervalo a_+ hasta a_- para todos los propósitos prácticos es igual a uno y la probabilidad de x_i caiga fuera de ese intervalo es esencialmente cero

Si no existe un conocimiento específico acerca de los posibles valores de X_i podríamos suponer que es igualmente probable para X_i tomar cualquier valor dentro del intervalo. Entonces X_i es el punto medio del intervalo o sea $X_i = \frac{a_+ + a_-}{2}$ y con varianza asociada (S^2) sería $u(X_i) =$

$\sqrt{\frac{(a_+ + a_-)^2}{12}}$ ahora si la diferencia entre los límites a_+ y a_- , se denota por $2a$ entonces la ecuación

para esta distribución se convierte en: $u(X_i) = \sqrt{\frac{(2a)^2}{12}} = u(X_i) = \sqrt{\frac{4a^2}{12}} = u(X_i) = \sqrt{\frac{a^2}{3}} =$

$u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{3}}$ (Chacon, J., 2004).

Distribución triangular

En muchos casos es razonable reemplazar la distribución rectangular simétrica con una distribución triangular, de tal manera que X_i o el valor esperado tiene una varianza asociada:

$$- u^2(X_i) = \frac{a^2}{6} \text{ y } u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{6}}$$

Esta distribución debe usarse cuando el analista tenga un conocimiento previo que justifique su utilización, por ejemplo, en el uso de los materiales volumétricos clase A la experiencia dice

que el volumen vertido o contenido por él mismo está más cerca del valor nominal que fuera de él (Chacon, J., 2004).

2.1.11.1.3. Incertidumbre estándar combinada

La incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$ es la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo éstos, las varianzas o covarianzas de esas otras magnitudes ponderadas de acuerdo a como varía el resultados de la medición con respecto esas magnitudes (CENAM , 2005).

2.1.11.1.4. Incertidumbre expandida

Se denota por U y se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar combinada $U_c(y)$ por un factor de cobertura k : $U = k u_c(Y)$. El resultado de la medición se expresan como $Y = y \pm U$ (Chacon, J., 2004).

2.1.12. Política para la validación de métodos de laboratorios de ensayos y calibración según la política de la Oficina Nacional de Acreditación

El Organismo Nacional de Acreditación es un ente público sin fines de lucro, que se rige bajo las directrices establecidas en las Normas Técnicas Nicaragüense para la Evaluación de la Conformidad, en las Políticas, Reglamentos y Procedimientos de la ONA; motivando a empresas, instituciones y organismos privados y públicos a participar de las ventajas que proporciona un sistema confiable, transparente y reconocido a nivel mundial, que facilita el intercambio con los mercados externos (MIFIC, s.f.).

Este organismo establece una guía para las actividades de validación de métodos de ensayo y calibración no normalizados, desarrollados o diseñados por el laboratorio, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados y para las verificaciones necesarias para confirmar que el laboratorio puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos (ONA, 2012).

Dentro de los requisitos generales para la validación están:

1. Pasos para la validación:

- Establecimiento del protocolo de validación.
- Realización de la validación.
- Elaboración del informe de validación.

2. Establecimiento y condiciones del alcance de la validación:

- Establecimiento del alcance de la validación:

Se diferencian tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

a. Se trata de un método de ensayo estandarizado y normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en la norma/procedimiento.

b. Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado o cuando se use un método proporcionado por el proveedor de un equipo o sistema analítico.

Ejemplos: un método de extracción diferente u otra matriz, rangos distintos de trabajo.

c. Se trata de un método de ensayo desarrollado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos (ONA, 2012).

Objetivos de acuerdo al alcance de la validación:

- **Caso 1. Método normalizado:** Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente (Verificación).

- **Caso 2. Método normalizado modificado o no normalizado:** Comprobación de que la modificación introducida en el método original no afecta la capacidad del laboratorio para proporcionar resultados confiables. Ejemplos: Cambio del método de extracción, otra matriz, cambios en el pH. Demostrar que el método proporcionado por el fabricante es capaz de dar resultados confiables para el fin propuesto.

- **Caso 3. Método desarrollado/ interno:** Comprobación de que el método cumple con las características necesarias para dar resultados confiables para el fin propuesto.

2.2. Antecedentes

En todo el mundo se realizan millones de determinaciones analíticas, donde se obtienen datos acerca de diferentes matrices y materiales. Básicamente, estamos hablando de determinaciones costosas, no sólo por ellas en sí, sino por las decisiones que se toman a partir de sus resultados. Es por eso que hay una creciente inquietud acerca de la forma de realizar las determinaciones analíticas, lo que implica cada vez mayores esfuerzos a no sólo de llevarlas a cabo correctamente, sino de que se pueda demostrar que los resultados obtenidos son confiables (Crubrellati, R., 2009). Por esta razón desde inicios del siglo XXI se han venido desarrollando normas y métodos que definen los parámetros que se deben cumplir en el laboratorio para llevar un aseguramiento de control de calidad en los laboratorios e industrias (Shewhart., W., 1986).

El control de calidad moderno inicio su desarrollo alrededor de 1920 en los Estados Unidos. Uno de los precursores del concepto de calidad moderno fue el Dr. Walter A. Shewhart (1891-1967) el Introdujo el “Grafico de Control” como una herramienta efectiva en el control de la variación en un proceso de manufactura, marcando así el inicio formal del control de calidad moderno en 1931. En 1944 en los estados unidos se publicó la primera revista sobre Control de Calidad, la Industrial Quality Control y en 1946 se fundó en Estados Unidos, la American Society for Quality Control, la ASQC (Shewhart., W., 1986).

2.3. Hipótesis.

Los resultados emitidos por el laboratorio de Contaminantes Orgánicos del Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua (CIRA/UNAN-Managua), serán más confiables después de haber evaluados los parámetros de validación e incertidumbre, para la toma de decisiones en situaciones ambientales.



CAPITULO III

3.1. Diseño Metodológico

3.1.1. Descripción del ámbito de estudio

La evaluación de los parámetros de validación del método analítico para la determinación de la fracción media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua y el establecimiento de las condiciones instrumentales del Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de Ionización de llama (GG-FID) para la identificación y cuantificación de los analitos, se llevó a cabo en el laboratorio de contaminantes orgánicos del CIRA/UNAN-MANAGUA.

3.1.2. Tipo de estudio

- Experimental: debido a que se aplicó un método experimental de extracción líquido a líquido, así como también la técnica analítica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GG-FID) para la determinación y cuantificación de la fracción media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (Rango Orgánico de Diésel) en las muestras de agua.
- Descriptivo: ya que por medio de los resultados obtenidos al aplicar la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GG-FID) se analizaron y describieron diferentes características y el comportamiento de la fracción media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en las muestras de agua.

3.1.3. Población y Muestra

En la presente investigación se tomará la muestra no probabilísticas, pues se considera esta selección informal y derivada de un proceso arbitrario, la población en este estudio está definida por soluciones preparadas o fortificadas en el laboratorio a partir de agua destilada. Para este estudio se ha considerado una muestra no probabilística por conveniencia, considerando el número de ensayos propuestos por la ONA (ONA, 2012). Se analizaron un total de 29 muestras, dentro de las cuales están, las muestras fortificadas preparadas en el laboratorio, blancos del laboratorio y muestra de referencia (MR).

Criterios de selección

La selección del tamaño de muestras o muestreo se realizó en base al criterio de inclusión considerando la probabilidad de obtener respuesta positiva que permita estimar los parámetros de validación e incertidumbre del método para la Fracción Media de Hidrocarburos Totales de Petróleo, debido a la problemática de contaminación tanto al ambiente como la afectación a la salud pública.

3.1.4. Operacionalización de Variables

Tabla 2
Operacionalización de Variables

Variable independiente	Descripción conceptual	Sub-variable	Indicador
Método analítico	Establece la estabilidad y confiabilidad del método	Eficiencia del método	Determinación cualitativa y cuantitativa de la Fracción Media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo en agua
Fracción Media de los Hidrocarburos Totales de Petróleo	Esta abarca la fracción Rango orgánico de Diésel (C ₁₀ -C ₂₅) e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's)	Niveles de concentración	Fracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's) y la fracción de alifático (DRO)
Dependientes			
Criterios que determinan la validación del método		Condiciones instrumentales analíticas	Exactitud, Precisión, Sensibilidad, Selectividad/Especificidad, Linealidad del sistema, Linealidad del método y Rango, Limite de detección, Limite de cuantificación, y cálculo de la incertidumbre

3.1.5. Material y Método

3.1.5.1. Materiales para recolectar información

Los materiales utilizados para recolectar información fueron: tesis de grado, tesis de posgrado, libros online, documentos sacados de sitios web, revistas científicas, páginas web.

3.1.5.2. Materiales para procesar la información

Para procesar la información se utilizaron programas: Microsoft Word 2013, Microsoft Excel 2013 y el programa MAPLE 18 (programa matemático).

3.1.5.3. Equipos, reactivos y materiales de laboratorio

Equipos

Los equipos que se utilizaron durante el desarrollo del proceso analítico, consisten en aparatos eléctricos, estos facilitaron las mediciones requeridas.

Balanza electrónica, con un rango de masa de Max' 0 g a 150 g, escala 0,0001 g modelo AE 160, marca Mettler instrument, PE 1600, en la cual se hace una corroboración una vez al día por el laboratorio y es calibrada una vez al año por el Laboratorio Nacional de Metrología (LANAMET-MIFIC),

El rota evaporador BUCHI 461, bomba de vacío (Gasty), baño de agua (Gallenkamp), se utilizó en la evaporación de la mezcla de solvente y en el cambio de Diclorometano a Hexano.

Campana extractora de gases, instrumento que facilitó la manipulación de las sustancias en el momento de prepararse las mezclas de solventes y estándares.

Cromatógrafo de gases CLARUS-500GC con detector de Ionización de llama (FID).

Materiales

Cristalería

Durante el proceso analítico se utilizaron: probetas, pipetas volumétricas, micropipetas de constricción, buretas y balones volumétricos, estos fueron calibrados a la temperatura de trabajo del laboratorio. Estos materiales volumétricos presentan diferentes tolerancias especificados por el fabricante. En la *Tabla 3*. Se muestran los materiales volumétricos utilizados y su tolerancia de fábrica.

Tabla 3

Materiales volumétricos (Vidrio clase A) con tolerancia del fabricante

Cristalería	Volumen
Pipetas	1,00 ± 0,01 mL
	2,50 ± 0,01 mL
Micropipetas	250,00 µL ± 0,90%
	100,00 µL ± 0,90%
	200,00 µL ± 0,90%
	300,00 µL ± 0,90%
	400,00 µL ± 0,90%
Slow Flow	500,00 µL ± 0,90%
Matraces	50,00 ± 0,05 mL
	5,00 ± 0,02 mL
Probeta	1,00 ± 0,01 mL
	2,00 ± 0,01 mL
	25,00 ± 0,03 mL
	10,00 ± 0,02 mL
Bureta	100,00 ± 0,08 mL
	1000,00 ± 6,00 mL
Embudo de separación	100,00 ± 1,00mL
	50,00 ± 0,05 mL
Embudo de vidrio	2000,00 mL
	--

Tabla 4

Otros materiales utilizados en el análisis

- Columna Capilar PerkinElmer Elite-5 semi polar de 30 m de largo 0,53 mm de diámetro interno	- Espátula
- Nitrógeno alta pureza 99,9999 % (UHP) Nitrógeno T/220 grado industrial	- Frascos mostaceros
- Soporte universal	- Guantes látex
- Tubos de ensayo de 12 mL	- Lana de vidrio
- Varillas de vidrio	- Papel de Aluminio
- Viales de 1,9 mL	- Pera de succión
	- Pipeta Pasteur
	- Septas

Reactivos

Los reactivos utilizados durante el proceso analítico fueron:

- Sulfato de Sodio CAS [7757-82-6], Fisher Scientific, 60-100 mesh, 99 % previamente calentado a 550°C durante 4 horas, mantenido en horno a una temperatura de 130°C y antes de ser utilizado es colocado en un desecador hasta que éste alcance la temperatura ambiente.
- Silica Gel activada a una temperatura de 550 °C durante 6 horas.
- n-Hexano CAS [110-54-3], Fisher Scientific, grado pesticida.
- Diclorometano CAS [75-09-02], Fisher Scientific, grado pesticida. En la *Tabla 5* se especifican las propiedades de los solventes utilizados en la extracción.

Tabla 5

Solventes utilizados en la extracción

Propiedades	Solventes	
	Diclorometano	Hexano
Marca	Fischer Scientific	Fischer Scientific
Grado	Pesticida	Pesticida
Densidad relativa	(g/mL): 1,33	(g/mL): 0,65
Punto de ebullición	39°C	69°C

Tabla 6

Estándares analíticos de alta pureza

Estándar	Concentración
Solución de Combustible Diésel (MR)	50000 ± 251,00 $\frac{\mu g}{mL}$
PAH's Mixture	2000 ± 170,00 $\frac{\mu g}{mL}$
DRO Mixture (tennessee/Mississippi)	1000 ± 80,00 $\frac{\mu g}{mL}$
O-terphenyl (Estandar interno)	99 %

3.1.5.4. Método

Las pruebas de ensayo utilizadas para la evaluación de la validación del método analítico, se llevaron a cabo siguiendo el método 8015D de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA), este método se puede usar para determinar las concentraciones de varios compuestos no halogenados, compuestos orgánicos volátiles y compuestos orgánicos semivolátiles por cromatografía de gases (EPA, 2003). Los parámetros de validación se evaluaron de acuerdo a la política que establece la Oficina Nacional de Acreditación (ONA, 2012).

3.2. Procedimiento Analítico

3.2.1. Limpieza y Calibración del Material Volumétrico

Asimilar la metodología de un ensayo de validación según la norma NTN 0400105 en el mejoramiento de la calidad de los resultados analíticos precisa la calibración del material volumétrico utilizado en la realización del ensayo, planteado lo anterior la calibración del material volumétrico se llevó a cabo para:

- Establecer sus límites de tolerancia al 95% y comparar si están dentro del rango de tolerancia establecido por el fabricante.
- Establecer la incertidumbre estándar.

Es importante que antes de utilizar cualquier material de vidrio éste esté debidamente limpio de tal manera que no produzca ningún tipo de contaminación en su utilización causando cualquier alteración en los resultados de los análisis, este procedimiento consistió en lo siguiente:

1. Se lavó la cristalería con agua de grifo, luego se preparó una solución de Extran - agua en una proporción 1:25.
2. Se depositó la cristalería en la solución (Extran – agua) ya preparada en un recipiente y se dejó hervir 60 min aproximado.
3. Después se lavó cuatro veces con agua destilada, luego se depositó en un recipiente que contenía una solución preparada de ácido clorhídrico: agua destilada en una proporción de 1:4 y se dejó durante 24 horas.
4. Se enjuago cuatro veces con agua destilada, posteriormente se secó en el horno durante cinco horas a una temperatura de 95 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente (CIRA/UNAN-Managua, 2013)

Una vez lavada la cristalería se procedió a la calibración de la cristalería:

La calibración de los recipientes volumétricos de vidrio (clase A), consiste en determinar el volumen de líquido verdaderamente contenido o entregado por el recipiente. Este volumen (V), se conoce midiendo la masa de líquido; para lo cual se mide la masa del recipiente vacío (Mb) y después la masa del recipiente lleno (Mc) hasta la marca de aforo con el líquido utilizado para la calibración (hexano, grado pesticida); la diferencia de masa de ambas mediciones (Mc – Mb)

será la masa del líquido contenida en el recipiente y luego se calculó el volumen medido aplicando la ecuación número (Ec. 1), planteada más adelante.

3.2.1.1. Procedimiento utilizado para la calibración de matraz

1. Se pesó el matraz vacío de 2 mL diez veces.
2. Se agregó al matraz hexano, hasta la marca de aforo y se pesó nuevamente.
3. Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró aproximadamente 1,00 mL de hexano del matraz aforado.
4. Luego se aforó nuevamente el matraz y se repitió este procedimiento al menos 10 Veces, se anotaron las masas de cada pesada (Trujillo, S., y Arias, R., 2002).

3.2.1.2. Procedimiento utilizado para la calibración de pipetas

1. Se pesó el matraz vacío 10 veces.
2. Se llenó la pipeta de 1 mL con hexano hasta la marca.
3. Se secó el exterior de la punta de la pipeta con papel kleenex.
4. Se depositó el hexano contenido en la pipeta dentro del matraz.
5. Se colocó el balón en la balanza y se anotó el peso obtenido.
6. Se repitió los pasos del 2 al 5, hasta obtener al menos 10 mediciones del volumen de hexano agregado al balón

Luego de la calibración se realizó el cálculo del volumen real contenido (en el caso del balón) o entregado (caso de las pipetas), se calcula por medio de la siguiente ecuación que constituye el modelo matemático:

$$V = (M_c - M_b) \left(\frac{1}{\rho_{\text{Hex}} - \rho_a} \right) \left(1 - \frac{P_a}{P_B} \right) (1 - \alpha (T_A - 20)) \quad \text{(Ec.1)}$$

Dónde:

- V = Es el volumen de agua contenido en el recipiente.

- $M_c - M_b$ = Masa del recipiente lleno (M_c), menos la masa del recipiente vacío (M_b) en gramos.
- ρ_{Hex} = Densidad del hexano, utilizado en la calibración, valor provisto por el fabricante y contenido en la etiqueta del recipiente. ($0,66 \frac{g}{cm^3} \pm 0,001$).
- ρ_{aire} = Densidad del aire calculada a las condiciones ambientales del laboratorio de contaminantes orgánicos con una temperatura de $22,6 \text{ }^\circ\text{C}$ la $\rho_a = 0,001 \frac{g}{cm^3}$. La incertidumbre en la densidad del aire para un intervalo de temperaturas de 15 a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ es de $\pm 1,30 * 10^{-6} \frac{g}{cm^3}$.
- ρ_B = Densidad de las pesas de la balanza, valor provisto por el fabricante $8000,00 \frac{Kg}{m^3} \cong (8,00 \frac{g}{cm^3} \pm 0,08)$
- α = Coeficiente de expansión cubica, que según el proveedor el valor para el vidrio boro silicato es de $9,90 * 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1} \pm 5,00 * 10^{-6}$.
- T_{Hex} = Temperatura del hexano durante la calibración. ($T = 22^\circ\text{C}$)

3.2.2. Preparación de soluciones

En esta etapa se prepararon soluciones estándares utilizadas para la cuantificación de la fracción media de los HTP; soluciones intermedias, soluciones de trabajo (Rango Orgánico de Diesel (DRO) e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's)). También se preparó soluciones intermedia y trabajo para la Solución de Combustible Diésel (MR). Además se preparó una solución de O-terfenil utilizado como estándar interno.

Preparación de soluciones intermedias

Las soluciones intermedias son todas aquellas que fueron preparadas a partir del estándar puro la cual se encuentra a una concentración más alta. Estas se prepararon con el objetivo de disminuir la concentración en caso que la solución madre sea demasiado alta y se corra el riesgo de dañar o mejor dicho contaminar la columna del cromatógrafo. Por lo tanto el propósito de preparar este tipo de soluciones (siempre y cuando sea necesario) es obtener una concentración más baja y adecuada del analito que se estudia.

La dilución obedece la siguiente ecuación:

$$V_1C_1 = V_2C_2 \quad (\text{Ec.2})$$

Dónde:

- V_1 = Volumen tomado del estándar puro.
- C_1 = Concentración del estándar puro.
- V_2 = Volumen a preparar de solución intermedia.
- C_2 = Concentración de la nueva solución Intermedia.

Preparación de las soluciones trabajo

Luego de tener preparadas las soluciones intermedias necesarias, se procedió a preparar la solución trabajo las cuales están a distintas concentraciones. Estas soluciones se prepararon con la (Ec.2).

La preparación de estas soluciones de trabajo se realizó con el fin de facilitar la selección de volúmenes a tomar en la preparación de la curva de calibración.

3.2.3. Curva de calibración

Preparadas las soluciones de calibración, se midieron en el instrumento analítico bajo las mismas condiciones que las utilizadas posteriormente para las muestras de agua, ya optimizado el método instrumental de trabajo y sin variar ninguna condición previa se logró definir la función respuesta del instrumento.

Tabla 7

Concentraciones de las soluciones (curva de calibración DRO-PAH's)

Volumen a tomar (μL) de la mezcla DRO Mixture (320,00 ng/ μL), y PAH's Mixtrue (340,00 ng/ μL)	Solvente	Volumen de aforo (mL)	C. final DRO (ng/ μL)	C. final PAH's (ng/ μL)
100,00	Hexano	2,00	16,00	17,00
100,00		1,00	32,00	34,00
200,00		1,00	64,00	68,00
300,00		1,00	96,00	102,00
400,00		1,00	128,00	136,00
500,00		1,00	160,00	170,00

La preparación de estos estándares consistió en medir cada uno de los volúmenes indicados en la tabla anterior con micro pipetas slow flow y adicionarlo a cada uno de los balones de 1 y 2 mL de capacidad los que contenían $\frac{1}{4}$ del volumen de solvente y luego se aforaron hasta la marca de aforo con ayuda de pipetas Pasteur.

3.2.4. Proceso de extracción de muestra

1. Agregar 1 litro de agua destilada en el embudo de separación.
2. Fortificar la muestra con 400,00 μL del estándar interno O-terfenil a 5,00 mg/L.
3. Agregar a la muestra 60,00 mL de diclorometano y agitar vigorosamente durante 2 minutos con venteos periódicos.

4. Dejar reposar la muestra durante 10 minutos para lograr una buena separación de la fase orgánica y la fase acuosa.
5. Filtrar la fracción orgánica con sulfato de sodio anhidrido y depositar en un balón de 250,00 mL. La etapa 3, 4 y 5 se repiten 2 veces más.
6. Una vez recolectadas las 2 fracciones orgánicas se reconcentra hasta obtener un volumen aproximado de 5,00 mL.
7. Realizar cambio de solvente a hexano, para esto se agregan 20,00 mL de hexano y nuevamente se reconcentra la muestra en el rotavaporador a 37 °C y 90 rpm hasta obtener un volumen aproximadamente de 2,00 mL.
8. Utilizando una pipeta pasteur se transfiere el extracto orgánico a un tubo de ensayo de 12,00 mL, se realizan enjuagues con hexano en el balón de 250,00 mL para asegurar que todo el extracto de la muestra haya sido depositada en el tubo de ensayo.
9. Evaporar el extracto orgánico contenido en el tubo de ensayo utilizando una corriente de gas nitrógeno inerte, hasta obtener un volumen aproximado de 1,00 mL.

3.2.4.1. Etapa de Limpieza y Fraccionamiento

1. Agregar en una bureta de 100,00 mL, Lana de vidrio, 5,00 g de silica gel y luego agregar aproximadamente 1,00 cm de sulfato de sodio anhidrido en la parte superior. Asegurar que el sulfato este lo bastante compactado para que no se fraccione la columna cuando se agreguen los solventes.
2. Para limpiar la columna de posibles interferencias agregar 20,00 mL de diclorometano y dejarlos pasar por la silica gel, evitar que la columna quede completamente seca, se recomienda cerrar la llave de la bureta 0,50 cm antes que el menisco del solvente alcance el sulfato de sodio.
3. Luego se agregan 30,00 mL de hexano en la columna, abrir la llave de la bureta y dejar pasar el solvente para asegurar que todo el diclorometano salga y quede completamente en hexano, de igual manera, se recomienda cerrar la llave de la bureta 0.50 cm antes que el menisco del solvente alcance el sulfato de sodio.

4. Una vez la columna está preparada agregar el mililitro de extracto obtenido en la etapa de extracción y eluir con 20,00 mL de hexano, el extracto se recoge en un balón de 250,00 mL, a esta fracción se le llama hidrocarburos alifáticos (F_1)
5. Agregar 20,00 mL de diclorometano y recoger el extracto en un balón de 250,00 mL, en esta etapa se obtienen los hidrocarburos aromáticos Policíclicos (F_2).
6. Reconcentrar ambos extractos en el rotaevaporador hasta obtener un volumen aproximado de 3,00 mL, a la F_2 hacer cambio de solvente a hexano.
7. Trasladar los extractos a los tubos de ensayo y evaporar el contenido, utilizando una corriente de gas nitrógeno inerte, hasta obtener un volumen aproximado de 0.20 mL.
8. Trasladar el contenido del tubo de ensayo a un matraz aforado de 1,00 mL, aforar con hexano y depositar el extracto en un vial de 1,50 mL para posteriormente ser inyectado en el cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GG-FID).

3.2.4.2. Inyección de muestras en el Cromatógrafo

Las muestras son inyectadas en un cromatógrafo de gases PerkinElmer Clarus-500 con una columna capilar PerkinElmer Elite-5 semi polar de 30 m de largo 0,53 mm de diámetro interno, y con detector de ionización de llama (GG-FID) con la siguiente programación:

- Temperatura del inyector: 250 °C.
- Temperatura del detector: 350 °C.
- Rampa de temperatura de la columna: Temperatura inicial 45 °C, temperatura final 275 °C, razón de variación de la temperatura 12 °C/minuto, Hold time 12 minutos.

Utilizando las condiciones antes mencionadas el total de tiempo de corrida es de 34,17 minutos.

3.3. Cuantificación de las concentraciones de la fracción media de HTP

Para determinar la concentración de la fracción media de los HTP se prepararon soluciones de calibración, como se muestra en la *Tabla 7* con los patrones de calibración los cuales se inyectaron directamente al equipo con las condiciones antes mencionadas. Una vez inyectadas las soluciones de calibración, se graficó la respuesta del instrumento (Área) vs la Concentración.

Concentración de las muestras

Para determinar las concentraciones de la fracción media de HTP en las muestras fortificadas se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_{Muestras} = \frac{A_{Muestra} * V_{Aforo}}{R_f * V_{Muestra}} = \frac{ng}{mL} \quad (\text{Ec.3})$$

- Análisis dimensional:

$$C_m = \frac{\frac{\mu L}{ng} * mL}{mL} = \frac{ng}{mL}$$

Dónde:

- $A_{Muestra}$: Área registrada por el cromatógrafo de gas, correspondiente a la Fracción Media de los HTP en la muestra fortificada.
- V_{Aforo} : Es el volumen al cual se afora la muestra.
- R_f : Es la división del área del estándar entre la concentración del estándar.
- $V_{Muestra}$: Volumen de la muestra.

Porcentaje de Recuperación

Al dividir la concentración de la muestra entre la concentración del estándar, podemos determinar el porcentaje recuperado, para ello utilizamos la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\text{concentracion de la muestra}}{\text{concentracion del estandar}} * 100 \quad (\text{Ec.4})$$

3.4. Evaluación de los parámetros de validación

Los parámetros de validación se evaluaron según la política establecida en la Oficina Nacional de Acreditación (ONA, 2012), para un método de ensayo normalizado modificado o uno no normalizado, determinando criterios de aceptación y de decisión establecidos, con la intención de demostrar que el método analítico es adecuado para la fracción media de los HTP en agua.

3.4.1. Exactitud

En este método de ensayo de validación, la exactitud se evaluó mediante la veracidad, la cual se calculó por medio del sesgo. Se fundamentó en el análisis de 6 réplicas fortificadas por un material de referencia (Solución de Combustible Diésel) a una concentración de $100,27 \pm 1,30$ ng/ μ L.

Luego se comparó con un contraste estadístico adecuado (t-student a un grado de confianza del 95% y n-2 grados de libertad, obteniendo el valor crítico de "t"= 2,78).el valor medido con el valor del material de referencia utilizado.

Para evaluar el sesgo se utilizó la siguiente ecuación:

$$S = \bar{X} - X_0 \quad (\text{Ec.5})$$

Dónde:

- S= Sesgo.
- \bar{X} = Valor promedio de las lecturas obtenidas.
- X_0 = Valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

El contraste "t" de un valor conocido contra la media de las 6 réplicas analizadas se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$|t_{\text{calculado}}| = \frac{(\bar{X} - \mu_0)}{s/\sqrt{n}} \quad (\text{Ec.6})$$

Dónde:

- \bar{X} = Promedio de los valores de las concentraciones obtenidas.
- S= Desviación estándar del promedio de las concentraciones obtenidas.
- n= Número de réplicas.
- μ_0 = Valor esperado.

El criterio de decisión para la exactitud consiste: si $t_{exp} < t_{tab}$, el método analítico desarrollado tiene la exactitud requerida y ambos valores no son estadísticamente diferentes. Mientras que, si $t_{exp} > t_{tab}$ significa que el método analítico no es exacto y que existe un error sistemático por defecto (ONA, 2012).

3.4.2. Precisión

La precisión del método analítico se evaluó en términos de repetibilidad, consistió en el análisis 3 muestras fortificadas del material de referencia (Solución de Combustible Diésel) a diferentes concentraciones por triplicado, las cuales fueron medidas en una sola corrida, el mismo día y en el mismo equipo.

Para los resultados de las muestras fortificadas, se realizó un análisis de varianzas por el método de ANOVA (Miller, J., y Miller, J., 2002), para contrastar si las varianzas no se diferencian significativamente. El valor de referencia de “*F-crítico*” se obtuvo de las tablas estadísticas de Fisher (contraste de una cola), con un grado de confianza del 95% (ver Anexo 22), teniendo en cuenta que ν_1 = número de grados de libertad del numerador y ν_2 = número de grados de libertad del denominador, ocupando un valor crítico de “ $F_{2,6}$ ”= 5,143.

Las ecuaciones utilizadas para determinar la precisión se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 8

Ecuaciones de sumas de cuadrados y grados de libertad

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$\sum_i T_i^2/n - T^2/N$ (Ec.7)	h - 1
Dentro de muestras	Por diferencia $\sum_i \sum_j (X_{ij} - \bar{X})^2$ (Ec.8)	Por diferencia h(n-1)

(Miller, J., y Miller, J., 2002).

Dónde:

- N= nh: número total de medidas.
- T_i : Suma de las medidas en la e-sima muestra.
- T: Suma de todas las medidas, gran total.

El estadístico de prueba de $F = \text{Cuadrado medio entre muestras} / \text{Cuadrado medio dentro de muestras}$. Ver *cap. 4, sección 4.5.2*.

También se calculó el porcentaje de recobro a partir de las concentraciones adicionada, con la ec.4 y el coeficiente de variación se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$Cv_{y/x} = \frac{S}{\bar{x}} * 100\% \quad (\text{Ec.9})$$

Dónde:

- $Cv_{y/x}$ = Coeficiente de variación.
- S = Desviación estándar.
- \bar{x} = Promedio de los datos.

El criterio de decisión para la precisión consiste: en que el coeficiente de variación de los resultados para los datos correspondientes a la repetibilidad, no debe ser mayor de 5%. Al utilizar el análisis de varianza en la evaluación de la repetibilidad, se aplicara el criterio de Fisher, en cuyo caso el valor experimental de F debe ser menor que el valor crítico (ONA, 2012).

Los criterios de decisión para la prueba estadística consiste en (ONA, 2012):

- Si $F_{calculado} < F_{critico}$: varianzas no se diferencian significativamente.
- Si $F_{calculado} > F_{critico}$: varianzas se diferencian significativamente.

3.4.3. Sensibilidad

Se estableció a través del cambio en la respuesta del instrumento con respecto a la cantidad del mensurado presente. Se preparó un juego de 6 estándares a diferentes niveles de concentración para la fracción DRO y PAH's, se evaluó mediante el cálculo de la pendiente de la curva de calibración.

3.4.4. Selectividad/Especificidad

Las interferencias asociadas a esta metodología están en dependencia de la fuente de donde proviene la muestra ya que pueden ser aguas naturales (ríos, lagos, etc.) o agua residual

(efluentes industriales). El detector FID es universal y destructivo, lo cual indica que no es selectivo para moléculas específicas y registra todas las señales que llegan al equipo. Una manera de disminuir las interferencias es utilizando las técnicas de limpieza y fraccionamiento con un absorbente específico, en este caso se utiliza sílica gel para retener algunas impurezas que puedan estar en los extractos orgánicos y de esta manera mejorar la línea base del cromatograma en la muestra.

En este método la selectividad depende de las características propias del compuesto. Generalmente los hidrocarburos alifáticos poseen una respuesta cromatográfica particular que facilita la identificación de estos. El cromatograma está conformado por una serie de picos que son característicos para cada fracción del petróleo, en el caso del rango orgánico de diésel (DRO) se encuentran señales de hidrocarburos alifáticos de manera continua desde n-decano (C₁₀) hasta n-pentacosano (C₂₅).

3.4.5. Límite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC)

El límite de detección y el límite de cuantificación de la fracción media de HTP se determinaron tanto para el sistema como para el método analítico.

El Límite de detección y de cuantificación del sistema (instrumento), se calcularon por medio de Meier y zund (Meier, P., y Zund, R., 2000), así se logró determinar la concentración mínima detectable y determinable, así mismo la concentración mínima cuantificable del sistema instrumento). Ver ecuaciones en *Anexo 6*.

Resultados en *cap.4, sección 4.5.4. Tabla 19*.

El límite de detección y el límite de cuantificación del método se calcularon mediante el análisis repetido del blanco matriz (ONA, 2012), son todos los excipientes, excepto el analito de interés. Se analizaron diez réplicas de blancos de la muestra para la fracción DRO y seis réplicas de blancos para la fracción PAH's. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación, según la política de ONA para procedimientos cromatográficos:

$$LD \text{ o } LC = \frac{Y_{blanco} + Ks_{blanco}}{b} \quad \text{(Ec.10)}$$

Dónde:

- LD o LC : Límite de detección del método o límite de cuantificación del método.
- Y_{blanco} : Media de la respuesta de los n blancos (áreas).
- s_{blanco} : Desviación estándar de la respuesta de los n blancos.
- b : Pendiente.
- K : Constante; $K = 3$ para límite de detección, $K = 10$ para límite de cuantificación.

Resultados en *cap. 4, sección 4.5.4.*

3.4.6. Linealidad del método y rango

En este ensayo de validación el comportamiento lineal del método se demostró dentro del rango en el cual se trabajarían las muestras, lo cual se realizó tomando en cuenta que esta determinación es un método de ensayo de principio activo (ONA, 2012), estableciéndose así los intervalos dentro de los cuales se llevó a cabo las pruebas.

La evaluación práctica de este parámetro consistió en preparar por triplicado muestras fortificadas por un material de referencia (Solución de Combustible Diésel) a tres niveles de concentración diferentes, con un nivel de concentración superior e inferior a la concentración del analito en la mezcla de trabajo.

La concentración del nivel central debe ser igual a la que comúnmente se prepara la solución de trabajo para el análisis con el método, es decir la concentración de la mezcla de trabajo corresponde al nivel central (ONA, 2012). Ver *Tabla 21, en cap.4, sección 4.5.5.*

Luego de realizar los análisis de las distintas muestras fortificadas se aplicó el contraste estadístico de *t-student* a un grado de confianza del 95% y $n-2$ grados de libertad, tomando un valor crítico de " t_2 " = 12,71, para la correlación (r), pendiente (b) y para el intercepto (a), para demostrar si el método es lineal o no. Las ecuaciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9

Ecuaciones con respecto al estadístico de prueba para la correlación, pendiente e intercepto

Contraste estadístico de <i>t-student</i>		
r	b	a
$t = \frac{ r \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$ (Ec.11)	$t_{calculado} = \frac{ b }{s_b}$ (Ec.12)	$t_{calculado} = \frac{ a }{s_a}$ (Ec.13)
Criterios de decisión para la prueba estadística		
$t_{calculado} > t_{critico}$		$t_{calculado} < t_{critico}$
H_0 = la correlación entre la variación de la cantidad adicionada y la variación de la cantidad recuperada es significativa.	H_0 = la pendiente se diferencia significativamente de cero.	H_0 = el intercepto no se diferencia significativamente de cero.

Para la determinación de “*r*”, “*r*²”, “*b*”, “*a*”, “*S_b*” y “*S_a*” Se calcularon mediante las ecuaciones del Meier y Zund (Meier, P., y Zund, R., 2000). Ver ecuaciones Anexo 11, resultados en cap.4, sección 4.5.5

El porcentaje de recobro se realizó mediante la ec.4 y el coeficiente de variación con la ec.9.

Los criterios de aceptación, según la cantidad adicionada vs señal obtenida son: $r^2 = \geq 0.995$ (el criterio de aceptación definido por el laboratorio dependerá del tipo de análisis y del nivel de concentración del analito en la matriz.), IC(b); no debe incluir el cero, el coeficiente de variación de regresión (del porcentaje de recobro) no > 2% si el método es volumétrico o cromatográfico (ONA, 2012).

3.4.7. Linealidad del sistema

Para determinar la linealidad del sistema se preparó por triplicado 6 niveles de concentración (intervalo o rango) de la solución de trabajo (ver Tabla 23), en cap. 4, sección 4.5.6, calculando el coeficiente de determinación (*r*²) y coeficiente de correlación (*r*), los cuales se determinaron

mediante las ecuaciones de Meier y Zund (Meier, P., y Zund, R., 2000). (Ver ecuaciones Anexo 12).

Luego se aplicó el contraste estadístico *t-student* a un grado de confianza del 95%, y n-2 grados de libertad, tomando un valor crítico de “ t_4 ”= 2,78, para demostrar si la correlación a partir de la respuesta de medición de las soluciones de calibración es realmente significativo es decir si la relación es lineal. Resultados en *cap.4, sección 4.5.6*.

Los criterios de aceptación son $r^2= 0.98$, IC (β_1) no debe incluir el cero. Otros criterios de aceptación deben ser justificados (ONA, 2012)

3.4.8. Límites de confianza para la curva de calibración para la fracción media de HTP

Para poder determinar el intervalo de confianza de las curvas se determinó:

$$S_{yy} = \sum(yi^2) - (\sum yi)^2 / n \quad (\text{Ec.14})$$

$$S_{xx} = \sum(xi^2) - (\sum xi)^2 / n \quad (\text{Ec.15})$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\left(S_{yy} - \left(\frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \right) \right)}{n-2}} \quad (\text{Ec.16})$$

Luego de haber obtenido los valores de S_{yy} , S_{xx} y S_y se determinó los límites de confianza de las curvas, para esto se utilizó el método de Meier y Zünd, por tanto se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$Y_0(i) = \pm LC95\% \quad (\text{Ec.17})$$

$$LC95\% = S_y * t * \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{[x(i)-\bar{x}]^2}{S_{xx}}} \quad (\text{Ec.18})$$

$$Y_0(i) = \pm S_y * t * \sqrt{\frac{1}{n} + [x(i) - \bar{x}]^2 / S_{xx}} \quad (\text{Ec.19})$$

El valor $Y_0(i)$ es el valor corregido de Y (área corregida), se calculó utilizando la ecuación de la recta:

$$Y_0 = a + bx(i) \quad (\text{Ec.20})$$

Dónde:

- Y_0 = Área corregida del patrón.
- b = Pendiente de la recta.
- a = Ordenada en el origen.
- $x(i)$ = Concentración.

Mostrados en *Anexo 22* y *Anexo 23*.

3.5. Incertidumbre de los resultados

3.5.1. Incertidumbre en la calibración del material Volumétrico

Como parte del control de la calidad se debe asegurar la uniformidad, la validez técnica y la trazabilidad de cada medición; en este sentido radica la importancia de estimar numéricamente la incertidumbre combinada y expandida del material volumétrico que utilizamos en el laboratorio, pues estas nos describen el estado y desempeño de dicho material, a la vez que nos brinda el estimado de la dispersión que se puede causar por las distintas condiciones bajo la que hacemos las mediciones.

Incertidumbre combinada (u)

Después de haber calculado el volumen ya sea contenido o entregado por la cristalería utilizada, se procedió a calcular la incertidumbre combinada de los mismos, haciendo uso de la ecuación siguiente:

$$u_{balon} = \sqrt{(C_{Mb} * u_{Mb})^2 + (C_{Mc} * u_{Mc})^2 + (C_{\rho Hex} * u_{\rho Hex})^2 + (C_{THex} * u_{THex})^2 + (C_{\rho a} * u_{\rho a})^2 + (C_{\alpha} * u_{\alpha})^2 + (C_{\rho B} * u_{\rho B})^2} \quad \text{(Ec.21)}$$

Dónde:

- $u_{balón}$: Incertidumbre combinada del balón.
- u_{Mb} : Incertidumbre de la masa del recipiente vacío.
- u_{Mc} : Incertidumbre total de la masa del recipiente lleno

- $u_{T_{Hex}}$: Incertidumbre de la temperatura del hexano.
- $u_{\rho_{Hex}}$: Incertidumbre de la densidad del hexano.
- u_{ρ_B} : Incertidumbre de la densidad de las pesas de la balanza.
- u_{ρ_a} : Incertidumbre de la densidad del aire (valor convencional).
- u_{α} : Incertidumbre del coeficiente de expansión cúbica del vidrio.
- c_{M_b} : Coeficiente de sensibilidad de la masa del recipiente vacío.
- c_{M_c} : Coeficiente de sensibilidad de la masa del recipiente lleno.
- $c_{\rho_{Hex}}$: Coeficiente de la densidad del hexano.
- c_{ρ_a} : Coeficiente de sensibilidad de la densidad del aire.
- c_{α} : Coeficiente de sensibilidad para el coeficiente de expansión cúbica.
- c_{ρ_B} : Coeficiente de sensibilidad para la densidad de las pesas de la balanza.
- $c_{T_{Hex}}$: Coeficiente de sensibilidad de la temperatura del hexano.
- U: Incertidumbre expandida.

3.5.1.1. Identificación y organización de las fuentes de incertidumbre

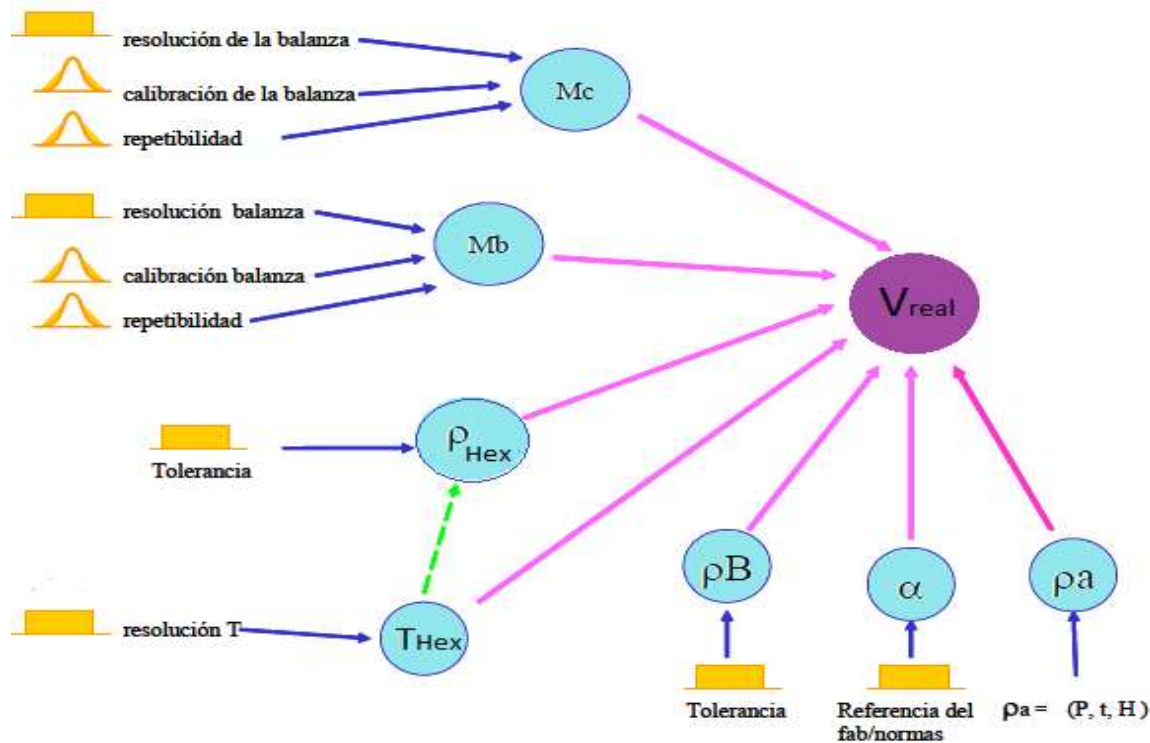


Figura 6 Diagrama de las fuentes de incertidumbre

Incertidumbre de la masa de los recipientes

La incertidumbre de las masas del recipiente lleno o vacío se calculó al combinar la incertidumbre por la repetibilidad de los resultados de las distintas pesadas, la resolución de la balanza y la incertidumbre de la calibración, según el certificado de calibración. El modelo matemático es el siguiente:

$$u_{Mb} = \sqrt{u_{(Mbrep)}^2 + u_{(Mbres)}^2 + u_{(Cert.calibración)}^2} \quad (\text{Ec.22})$$

Donde:

- u_{Mbrep} = Incertidumbre del recipiente lleno o vacío por la repetibilidad de las mediciones.
- u_{Mbres} = Incertidumbre de recipiente lleno o vacío por la resolución de la balanza.
- $u_{cert.calibración}$ = Incertidumbre según el certificado de calibración de la balanza.

Incertidumbre por la repetibilidad de las mediciones

La incertidumbre por la repetibilidad de los resultados tanto para el recipiente vacío (M_b) como para el recipiente lleno (M_c) se calculó con la siguiente ecuación:

$$u_{(M_b, M_c)} = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (\text{Ec.23}).$$

Incertidumbre según el certificado de calibración

El certificado de calibración de la balanza analítica utilizado, indica incertidumbres expandida a diferentes cargas de prueba, con un intervalo de confianza del 95%, $k = 2$. La Incertidumbre estándar según el certificado de calibración se calculó para una distribución normal.

$$u_{\text{Cert. calibración}} = \frac{u_{\text{expandida}}}{2} \quad (\text{Ec.24})$$

Incertidumbre por la resolución de la balanza

La resolución de la balanza es de 0,0001 g, la incertidumbre estándar se calculó considerando una distribución rectangular mediante la siguiente ecuación (Trujillo, S., y Arias, R., 2002):

$$u_{\text{Resolución}(M_b, M_c)} = \frac{\text{valor del fabricante}}{\sqrt{12}} \quad (\text{Ec.25})$$

Incertidumbre de la temperatura

Se determina con la incertidumbre de la resolución del termómetro haciendo uso de la tolerancia provista por el fabricante ($\pm 1^\circ\text{C}$). Se calculó por medio de la ec.25.

Incertidumbre del coeficiente de expansión cúbica

La información técnica que proporciona el fabricante, indican el valor de $9,90 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ para el coeficiente de expansión cúbica (α) del vidrio de borosilicato, reportando a la vez una tolerancia de $\pm 5 \times 10^{-6}$, el cálculo de la incertidumbre se realizó usando la siguiente ecuación:

$$u_{\alpha} = \frac{2 * \text{Tolerancia del } \alpha}{\sqrt{12}} \quad (\text{Ec.26})$$

Incertidumbre de la densidad de las pesas de la balanza

La variación promedio de la densidad de las pesas de acero inoxidable es de $\pm 0,08 \text{ g/cm}^3$. La incertidumbre estándar se calculó para una distribución de probabilidad rectangular.

$$u_{\rho B} = \frac{2 * \text{Tolerancia de las pesas}}{\sqrt{12}} \quad (\text{Ec.27})$$

Incertidumbre de la densidad del hexano

La densidad y tolerancia provista por el fabricante para el hexano es de $0,66 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \pm 0,001$, para determinar la incertidumbre se estima como una distribución rectangular simétrica y se calculó a partir de la tolerancia de fábrica por medio de la siguiente ecuación.

$$u_{\rho \text{ Hex}} = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \rightarrow \quad a = \frac{\text{valor superior} - \text{valor inferior}}{2} \quad (\text{Ec.28})$$

3.5.1.2. Coeficientes de sensibilidad de la incertidumbre del material volumétrico

Las ecuaciones de los coeficientes de sensibilidad se obtuvieron de la derivada parcial de la ec. 1. Que es la que relaciona todos los parámetros y condiciones involucradas en el momento de la medición. Cabe mencionar que estas derivadas se obtuvieron utilizando el programa para matemática MAPLE 18. Ver anexo 33.

- Coeficiente de sensibilidad de la masa del recipiente vacío:

$$C_{Mb} = \frac{\partial V}{\partial (Mb)} = - \left(\frac{1}{\rho_{\text{Hex}} - \rho_a} \right) \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_B} \right) (1 - \alpha (T_{\text{Hex}} - 20)) \quad (\text{Ec.29})$$

- Coeficiente de sensibilidad de la masa del recipiente lleno:

$$C_{Mc} = \frac{\partial V}{\partial (Mc)} = \left(\frac{1}{\rho_{\text{Hex}} - \rho_a} \right) \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_B} \right) (1 - \alpha (T_{\text{Hex}} - 20)) \quad (\text{Ec.30})$$

- Coeficiente de sensibilidad de para la densidad del Hexano:

$$c_{\rho_{Hex}} = \frac{\partial v}{\partial \rho_{Hex}} = (Mc - Mb) \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_B}\right) (1 - \alpha(T_{Hex} - 20)) \left(\frac{-1}{(\rho_{Hex} - \rho_a)^2}\right) \quad (\text{Ec.31})$$

- Coeficiente de sensibilidad de la densidad del aire:

$$c_{\rho_a} = \frac{\partial v}{\partial \rho_a} = (Mc - Mb) (1 - \alpha(T_{Hex} - 20)) \left(\frac{-1}{\rho_B(\rho_{Hex} - \rho_a)} + \left(\frac{\rho_B - \rho_a}{\rho_B}\right) \left(\frac{1}{(\rho_{Hex} - \rho_a)^2}\right) \right) \quad (\text{Ec.32})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el coeficiente de expansión cúbica:

$$c_{\alpha} = \frac{\partial v}{\partial \alpha} = (Mc - Mb) \left(\frac{1}{(\rho_{Hex} - \rho_a)}\right) \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_B}\right) (20 - T_{Hex}) \quad (\text{Ec.33})$$

- Coeficiente de sensibilidad para la densidad de las pesas de la balanza:

$$c_{\rho_B} = \frac{\partial v}{\partial \rho_B} = (Mc - Mb) \left(\frac{1}{(\rho_{Hex} - \rho_a)}\right) (1 - \alpha(T_{Hex} - 20)) \left(\frac{\rho_a}{(\rho_B)^2}\right) \quad (\text{Ec.34})$$

- Coeficiente de sensibilidad para la temperatura:

$$c_{T_{Hex}} = \frac{\partial v}{\partial T} = (Mc - Mb) \left(\frac{1}{(\rho_{Hex} - \rho_a)}\right) \left(1 - \frac{\rho_a}{(\rho_B)}\right) (-\alpha) \quad (\text{Ec.35})$$

Como se puede observar anteriormente algunos coeficientes son negativos, esto resulta cuando una de las variables de la ecuación principal se le determina su derivada parcial y esta es indirectamente proporcional a la ecuación principal.

3.5.2. Incertidumbre expandida (U)

Una vez determinada la incertidumbre combinada del recipiente calibrado (matraz volumétrico o pipeta), se determinó la incertidumbre expandida; la cual se utiliza para definir un intervalo con cierto grado de confianza, dentro del cual se espera que se encuentre la cantidad que se está midiendo. Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada (u) por factor de cobertura k ; para un grado de confiabilidad del 95%, $k=2$.

$$U = u * k \quad \text{(Ec.36)}$$

Los resultados obtenidos en la estimación de la incertidumbre sobre la calibración del material volumétrico se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 10

Material volumétrico con su incertidumbre asociada

Cristalería	volumen
Pipetas	1,00 ± 0,01 mL
	2,50 ± 0,02 mL
Micropipetas Slow Flow	250,00 ± 0,002 µL
	100,00 ± 0,001 µL
	200,00 ± 0,002 µL
	300,00 ± 0,002 µL
	400,00 ± 0,001 µL
	500,00 ± 0,01 µL
	50,00 ± 0,10 mL
Balones	5,00 ± 0,02 mL
	1,00 ± 0,01 mL
	2,00 ± 0,02mL
	25,00 ± 0,10 mL
	10,00 ± 0,02 mL
Probeta	100,00 ± 0,20 mL
	1000,00 ± 45,00 mL

3.5.3. Incertidumbre en la preparación de las soluciones

Cada una de las soluciones estándares preparadas está ligada a una incertidumbre causada por distintas variables o constantes involucradas en la medición, a continuación se plantea el procedimiento para determinar cada uno.

Incertidumbre asociada a la preparación de la solución intermedia

La incertidumbre de esta solución se determina al combinar la incertidumbre del volumen tomado del estándar puro (incertidumbre de la pipeta utilizada V_1), con la incertidumbre en la concentración de este mismo (C_1) y la del volumen a preparar de la solución (volumen de aforo C_2), cada una multiplicada por su respectivo coeficiente de sensibilidad, el modelo matemático correspondiente es:

$$u_{Ci} = \sqrt{(u_{Cp} * c_{Cp})^2 + (u_{vp} * c_{vp})^2 + (u_{vi} * c_{vi})^2} \quad (\text{Ec. 37})$$

Dónde:

- u_{Ci} : Incertidumbre en la concentración de la solución intermedia.
- u_{vi} : Incertidumbre del balón de aforo.
- u_{Cp} : Incertidumbre en la concentración del estándar puro.
- u_{vp} : Incertidumbre del volumen del estándar puro (Incertidumbre de la pipeta utilizada)
- c_{Cp} : Coeficiente de sensibilidad del volumen del estándar puro.
- c_{vp} : Coeficiente de la concentración del estándar puro.
- c_{vi} : Coeficiente de sensibilidad del balón de aforo.

Coeficientes de sensibilidad:

Se obtienen al sustituir las ecuaciones obtenidas de la derivada parcial de la ecuación de la dilución (ec.2).

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado del estándar puro.

$$\frac{\partial}{\partial V_p} = \frac{c_p}{V_i} \quad (\text{Ec. 38})$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar puro

$$\frac{\partial}{\partial C_p} = \frac{V_p}{V_i} \quad (\text{Ec. 39})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución intermedia.

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = -\frac{V_p C_p}{V_i^2} \quad (\text{Ec. 40})$$

Incertidumbre asociada a la preparación de la solución trabajo

La ecuación de la incertidumbre también se expresa de la misma manera al igual que los coeficientes de sensibilidad.

$$u_{trabajo} = \sqrt{(u_{c_i} * c_{c_i})^2 + (u_{v_i} * c_{v_i})^2 + (u_{v_t} * c_{v_t})^2} \quad \text{Ec. 41}$$

Dónde:

- $u_{Trabajo}$: Incertidumbre en la solución de trabajo preparada.
- u_{c_i} : Incertidumbre del volumen tomado de la intermedia (incertidumbre de la pipeta utilizada)
- u_{v_i} : Incertidumbre en la concentración de la solución intermedia.
- u_{v_t} : Incertidumbre del volumen de la solución de trabajo (volumen de aforo).
- c_{c_i} : Coeficiente de sensibilidad del volumen de la solución intermedia.
- c_{v_i} : Coeficiente de sensibilidad de la concentración intermedia.
- c_{v_t} : Coeficiente de sensibilidad del volumen de la solución trabajo (incertidumbre del matraz de aforo).

Coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución intermedia.

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = \frac{C_i}{V_i} \quad (\text{Ec. 42})$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de la solución intermedia.

$$\frac{\partial}{\partial C_i} = \frac{V_i}{V_t} \quad (\text{Ec. 43})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución trabajo.

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = -\frac{V_i C_i}{V_t^2} \quad (\text{Ec.44})$$

Donde:

- C_i = Concentración intermedia
- V_i = Volumen de la concentración intermedia
- V_t = Volumen de la solución trabajo

Incertidumbre asociada a la concentración del estándar

$$u_{C_{std}} = \sqrt{(u_{ct} * c_{ct})^2 + (u_{vt} * c_{vt})^2 + (u_{vstd} * c_{vstd})^2} \quad (\text{Ec.45})$$

Coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de trabajo.

$$\frac{\partial}{\partial C_t} = \frac{V_t}{V_{std}} \quad (\text{Ec. 46})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución de trabajo.

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = \frac{C_t}{V_{std}} \quad (\text{Ec. 47})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución del estándar.

$$\frac{\partial}{\partial V_{std}} = -\frac{C_t V_t}{V_{std}^2} \quad (\text{Ec.48})$$

Donde:

- V_t = Volumen de la solución trabajo
- V_{std} = Volumen del estándar
- C_t = Concentración de la solución trabajo

3.6. Incertidumbre del método analítico

Para determinar la incertidumbre del método analítico se realizaron 10 réplicas del material de referencia (Solución de Combustible Diésel) a una concentración de 100,27 ng/μL. Para determinar las concentraciones de las muestras se hizo uso de la ec.3. Esta ecuación relaciona todos los parámetros involucrados en la medición, por lo tanto la ecuación para determinar la incertidumbre en las concentraciones recuperadas o la concentración final (C_{mf}) está dada por:

$$u_{cm} = \sqrt{(u_{A\text{ muestra}} * C_{A\text{ muestra}})^2 + (u_{VA\text{foro}} * C_{VA\text{foro}})^2 + (u_{Rf} * C_{Rf})^2 + (u_{Vmuestra} * C_{Vmuestra})^2} \quad (\text{Ec.49})$$

Dónde:

- $u_{A\text{ muestra}}$ =Incertidumbre en las áreas de la muestra.
- $u_{VA\text{foro}}$ = Incertidumbre en el volumen de aforo (balón de 1 ml).
- u_{Rf} = Incertidumbre de la división del área del estándar entre la concentración del estándar.
- $u_{Vmuestra}$ = Incertidumbre en el volumen de muestra.
- $C_{Amuestra}$ = Coeficiente de sensibilidad para el área de la muestra.
- $C_{VA\text{foro}}$ = Coeficiente de sensibilidad para el volumen de aforo.
- C_f = Coeficiente de sensibilidad para el factor de respuesta.
- $C_{Vmuestra}$ = Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la muestra.

Coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para el área de la muestra

$$\frac{\partial}{\partial C_{Amuestra}} = \frac{V_{aforo}}{R_f * V_{muestra}} \quad (\text{Ec.50})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de aforo

$$\frac{\partial}{\partial C_{VA\text{foro}}} = \frac{A_{muestra}}{R_f * V_{muestra}} \quad (\text{Ec.51})$$

- Coeficiente de sensibilidad para el factor de respuesta

$$\frac{\partial}{\partial CR_f} = -\frac{A_{muestra} * V_{aforo}}{R_f^2 * V_{muestra}} \quad (Ec.52)$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la muestra

$$\frac{\partial}{\partial C_{Vmuestra}} = -\frac{A_{muestra} * V_{aforo}}{V_{muestra}^2 * R_f} \quad (Ec.53)$$

3.6.1. Componentes de la incertidumbre

En general la incertidumbre comprende muchos componentes, la realización de un diagrama de causa y efecto permitió identificar las principales fuentes de incertidumbre de los resultados del proceso analítico. En la figura 7, se muestra la relación que existe entre las etapas del método y las componentes de la incertidumbre.

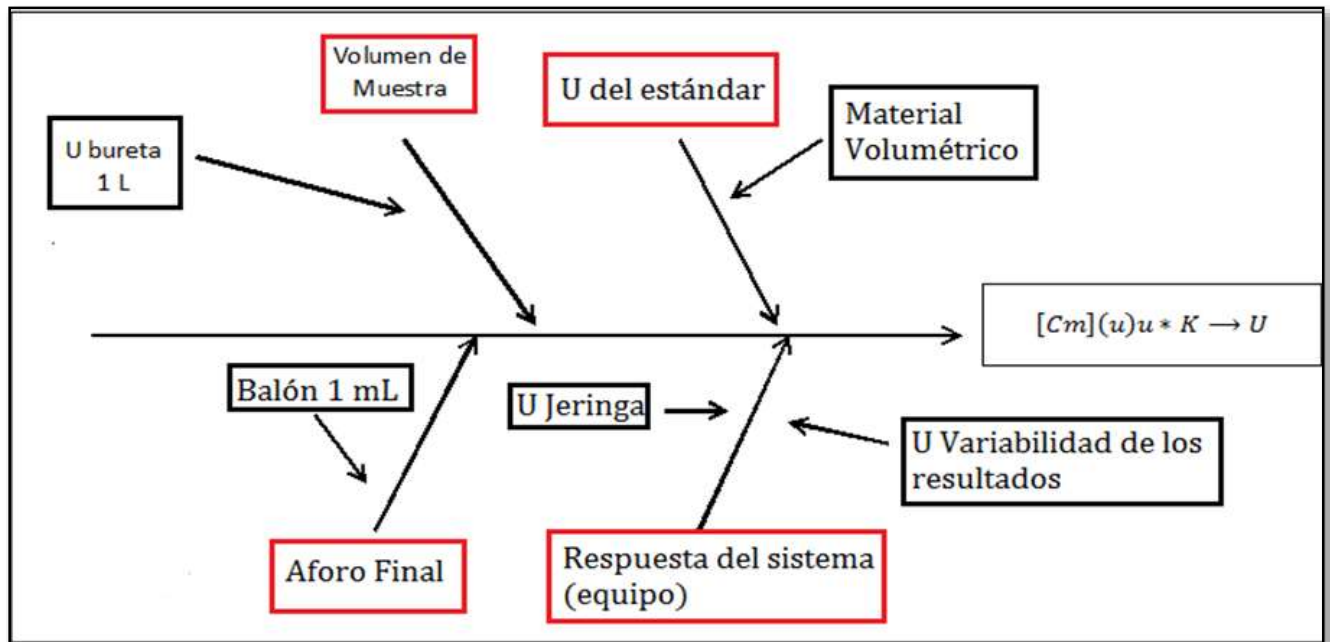


Figura 7. Diagrama de causa y efecto

3.6.2. Evaluación de la incertidumbre de los componentes

3.6.2.1. Área de la muestra

La $u_{A\text{ muestra}}$ se calculó al combinar la incertidumbre de la respuesta del sistema y la incertidumbre de la jeringa del sistema. El modelo matemático es el siguiente:

$$u_{A\text{ muestra}} = \sqrt{u_{RS}^2 + u_{js}^2} \quad (\text{Ec.54})$$

Dónde:

- u_{RS} : Incertidumbre de la respuesta del sistema.
- u_{js} : Incertidumbre de la jeringa del sistema.

Respuesta del sistema:

Para la u_{RS} se prepararon 6 réplicas de la solución del material de referencia (Solución de Combustible Diésel) a 100,27 ng/ μ L, las cuales se inyectaron en el sistema y luego se aplicó la siguiente ecuación:

$$u = \frac{\text{desviacion estandar de los resultados}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec.55})$$

Jeringa del sistema:

Para la u_{js} se determinó a partir de la tolerancia provista por el fabricante ($\pm 1\%$) y utilizando la siguiente ecuación:

$$u = \frac{\text{Tolerancia del fabricante \%}}{\sqrt{3}} \quad (\text{Ec.56})$$

3.6.2.2. Volumen de aforo

La u_{vAforo} corresponde a la incertidumbre del matraz de aforo de 1 mL, donde se afora la muestra para luego ser inyectada en el sistema.

3.6.2.3. Factor de respuesta

El Factor de Respuesta corresponde al cociente del área del estándar por la concentración del estándar.

$$R_f = \frac{A_{std}}{[std]} \quad (\text{Ec.57})$$

Después de haber calculado el R_f , se procede a calcular la incertidumbre combinada de los componentes de la ecuación anterior con sus coeficientes de sensibilidad, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$uR_f = \sqrt{(uA_{std} * cA_{std})^2 + (u[std] * c[std])^2} \quad (\text{Ec.58})$$

Dónde:

- uA_{std} = Incertidumbre del área del estándar.
- $u[std]$ = Incertidumbre de la concentración del estándar.
- cA_{std} = Coeficiente de sensibilidad para el área del estándar.
- $c[std]$ = Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar.

Coeficientes de sensibilidad

- Coeficiente de sensibilidad para el área del estándar.

$$\frac{\partial}{\partial A_{std}} = \frac{1}{[std]} \quad (\text{Ec.59})$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar.

$$\frac{\partial}{\partial [std]} = - \frac{A_{std}}{[std]^2} \quad (\text{Ec.60})$$

3.6.2.4. Volumen de la muestra

La incertidumbre del volumen de la muestra corresponde a la incertidumbre de la probeta de 1000,00 mL (1,00 L), que es el volumen tomado para llevar a cabo en el desarrollo del método analítico.

La $u_{V_{muestra}}$ se determinó a partir de la tolerancia provista por el fabricante ($\pm 6,00$ mL) y se calcula considerando una distribución triangular (Chacon, J., 2004).

$$u = \frac{\text{tolerancia del fabricante}}{\sqrt{6}} \quad (\text{Ec.61})$$



CAPITULO IV

4.1. Análisis y Discusión de los Resultados

En esta sección se plantean los cálculos de cada una de las etapas realizadas para el control de calidad y la evaluación del desempeño del método desarrollado para la fracción media de HTP en agua. Se muestran los cálculos de la calibración de la cristalería, los de la preparación de las soluciones estándares en estudio, el cálculo de incertidumbre en cada etapa de medición y los contrastes estadísticos de los parámetros de validación.

4.2. Cálculos del volumen en la calibración de la cristalería utilizada

El objetivo de la calibración es determinar la masa del volumen contenido o entregado por el recipiente de medición, luego con la masa determinada y haciendo uso de la *ec.1* podemos determinar el volumen que realmente mide dicho recipiente.

El material volumétrico se calibró a la temperatura de trabajo establecida en el laboratorio (22,6 °C), a continuación en la *Tabla 11* se presenta ejemplo de los resultados de la calibración para un matraz de aforo de 2,00 mL. Los resultados obtenidos para los demás materiales se presentan en *Anexo 5*.

Tabla 11

Resultados de la calibración del matraz de aforo de 2,00 mL

N°	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	11,5317	12,8530	1,3213
2	11,5316	12,8524	1,3208
3	11,5317	12,8528	1,3211
4	11,5317	12,8525	1,3208
5	11,5316	12,852	1,3204
6	11,5317	12,8524	1,3207
7	11,5317	12,8521	1,3204
8	11,5316	12,8514	1,3198
9	11,5317	12,852	1,3203
10	11,5317	12,8517	1,3200
promedio	11,53167	12,8522	1,3206
Desviación estándar	4,83 E-5	4,63 E-4	4,45 E-4
Tolerancia (±)		0,015	
Volumen Real (mL)		2,01	
Incertidumbre expandida (mL)		0,01	

Una vez obtenidos los valores anteriores se procedió a calcular el volumen real del matraz de aforo de 2,00 mL.

Sustituyendo ec.1.

$$V_{mL} = (1,32 \text{ g}) \left(\frac{1}{0,66 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} - 0,001 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} \right) \left(1 - \frac{0,001 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}}{8,00 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} \right) (1 - 9,90 \times 10^{-6} \text{C} (22 \text{ °C} - 20 \text{ °C}))$$

$$V_{mL} = 2,01 \text{ mL}$$

4.2.1. Estimación de la incertidumbre del material volumétrico

Para cada material volumétrico se determinó la incertidumbre expandida a un nivel del 95% de confiabilidad. A continuación se presenta el cálculo de las fuentes de incertidumbre en la calibración del matraz de aforo de 2,00 mL.

4.2.1.1. Incertidumbre de las masas

Incertidumbre por la repetibilidad de las mediciones:

Sustituyendo datos en ec.23.

Material vacío

$$u_{Mbrep} = \frac{1}{\sqrt{10}} * \sqrt{\frac{1}{10-1} * 2,10E - 8} \quad u_{Mbrep} = 1,53E - 5 \text{ g}$$

Material lleno

$$u_{Mcrep} = \frac{1}{\sqrt{10}} * \sqrt{\frac{1}{10-1} * 2,14E - 6} \quad u_{Mbrep} = 1,54E - 4 \text{ g}$$

Incertidumbre según el certificado de calibración

Sustituyendo datos en ec.24.

$$u_{Cert.calibración (Mb,Mc)} = \frac{0,0001}{2}$$

$$u_{Certi.Calibración (Mb,Mc)} = 5,00E-5 \text{ g}$$

Incertidumbre según la resolución de la balanza

Sustituyendo datos en ec.25.

$$u_{res(Mb,Mc)} = \frac{0,0001}{\sqrt{12}} = 2,89E - 5 \text{ g}$$

4.2.1.1.1. Incertidumbre de Mb

Sustituyendo datos en ec.22.

$$u_{Mb} \sqrt{(1,53E - 5 \text{ g})^2 + (2,89E - 5 \text{ g})^2 + (5,00E - 5 \text{ g})^2}$$

$$u_{Mb} = 5,97E - 5 \text{ g}$$

4.2.1.1.2. Incertidumbre de Mc

Sustituyendo datos en ec.22.

$$u_{Mb} \sqrt{(1,54E - 4 \text{ g})^2 + (2,89E - 5 \text{ g})^2 + (5,00E - 5 \text{ g})^2}$$

$$u_{Mb} = 1,65E - 4 \text{ g}$$

4.2.1.2. Incertidumbre en la densidad del hexano

La incertidumbre de la densidad del hexano y su tolerancia según el fabricante es: $0,659 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \pm 0,001$. La incertidumbre se calcula a partir de la tolerancia proporcionada por el fabricante:

Sustituyendo datos en ec.28.

$$u_{\rho \text{ Hex}} = \frac{\left(\frac{0,66-0,658}{2}\right)}{\sqrt{3}} \rightarrow u_{\rho \text{ Hex}} = 5,77E - 4 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

4.2.1.3. Incertidumbre de la temperatura

La incertidumbre de la temperatura se calcula por medio de la ec.25, utilizando la tolerancia proporcionada por el fabricante del termómetro utilizado.

$$u_{T_{hex}} = \frac{1}{\sqrt{12}} = 0,29 \text{ } ^\circ\text{C}$$

4.2.1.4. Incertidumbre del coeficiente de expansión cúbico

Sustituyendo datos en ec.26.

$$u_{\alpha} = \frac{2 * 5,00 E-6}{\sqrt{12}} \rightarrow u_{\alpha} = 2,89E - 6 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$$

4.2.1.5. Incertidumbre de la densidad de las pesas de la balanza

Sustituyendo datos en ec.27.

$$u_{\rho B} = \frac{(2)(0,08)}{\sqrt{12}} \rightarrow u_B = 0,05 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

4.2.1.6. Determinación de los coeficientes de sensibilidad para la calibración del material volumétrico

Los coeficientes de sensibilidad se obtienen por la derivada parcial en función de cada uno de los parámetros involucrados en la medición, que se utilizan en la ec.1.

- Coeficiente de sensibilidad de la masa del recipiente vacío:

Sustituyendo ec.29.

$$c_{Mb} = - \left(\frac{1}{0,66 \frac{g}{cm^3} - 0,0012 \frac{g}{cm^3}} \right) \left(1 - \frac{0,0012 \frac{g}{cm^3}}{8,00 \frac{g}{cm^3}} \right) (1 - 9,90E - 6 \text{ } ^\circ C (22^\circ C - 20 \text{ } ^\circ C))$$

$$c_{Mb} = -1,52$$

- Coeficiente de sensibilidad de la masa del recipiente lleno:

Sustituyendo ec.30.

$$c_{Mc} = \left(\frac{1}{0,66 \frac{g}{cm^3} - 0,0012 \frac{g}{cm^3}} \right) \left(1 - \frac{0,0012 \frac{g}{cm^3}}{8,00 \frac{g}{cm^3}} \right) (1 - 9,90E - 6 \text{ } ^\circ C (22^\circ C - 20 \text{ } ^\circ C))$$

$$c_{Mc} = 1,52$$

- Coeficiente de sensibilidad de la densidad del hexano:

Sustituyendo ec.31.

$$c_{\rho Hex} = (1,32) \left(1 - \frac{0,0012 \frac{g}{cm^3}}{8,00 \frac{g}{cm^3}} \right) (1 - 9,90E - 6 (22 - 20)) \left(\frac{-1}{\left(0,66 \frac{g}{cm^3} - 0,0012 \frac{g}{cm^3} \right)^2} \right)$$

$$c_{\rho Hex} = -3,05$$

- Coeficiente de sensibilidad de la densidad del aire:

Sustituyendo ec.32

$$C_{\rho a} = (1,32g)(1 - 9,90E - 6 \text{ } ^\circ\text{C}(22^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C})) \left(\frac{-1}{8,00 \frac{g}{\text{cm}^3} \left(0,66 \frac{g}{\text{cm}^3} - 0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)} \right) + \left(\frac{8,00 \frac{g}{\text{cm}^3} - 0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3}}{8,00 \frac{g}{\text{cm}^3}} \right) \left(\frac{1}{\left(0,66 \frac{g}{\text{cm}^3} - 0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)^2} \right)$$

$$c_{\rho a} = 2,80$$

- Coeficiente de sensibilidad para el coeficiente de expansión cúbica:

Sustituyendo ec.33.

$$c_{\alpha} = (1,32g) \left(\frac{1}{\left(0,66 \frac{g}{\text{cm}^3} - 0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)} \right) \left(1 - \frac{0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3}}{8,00 \frac{g}{\text{cm}^3}} \right) (20^\circ\text{C} - 22^\circ\text{C})$$

$$c_{\alpha} = -4,01$$

- Coeficiente de sensibilidad para la densidad de las pesas de la balanza:

Sustituyendo ec.34.

$$C_{\rho B} = (1,32) \left(\frac{1}{\left(0,66 \frac{g}{\text{cm}^3} - 0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)} \right) (1 - 9,90E - 6 \text{ } ^\circ\text{C}(22^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C})) \left(\frac{0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3}}{\left(8,00 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)^2} \right)$$

$$c_{\rho B} = 3,66E - 5$$

- Coeficiente de sensibilidad para la temperatura:

Sustituyendo ec.35.

$$C_{\text{Thex}} = (1,32) \left(\frac{1}{\left(0,66 \frac{g}{\text{cm}^3} - 0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)} \right) \left(1 - \frac{0,0012 \frac{g}{\text{cm}^3}}{\left(8,00 \frac{g}{\text{cm}^3} \right)} \right) (-9,90E - 6)$$

$$C_{\text{Thex}} = -1,98 E - 5$$

Como se puede observar los resultados de algunos coeficientes de sensibilidad son negativos, esto no influye para la determinación de la incertidumbre, debido a que el coeficiente es elevado al cuadrado en la ecuación.

Una vez calculadas las fuentes de incertidumbres y los coeficientes de sensibilidad de la calibración, se procedió a determinar la incertidumbre del matraz de 2,00 mL en tres pasos:

1. Sustituyendo los datos calculados anteriormente en la ec.21.

$$u_{balon} = \sqrt{\begin{aligned} & (5,97 E - 5 * (-1,52))^2 + (1,65 E - 4 * 1,52)^2 + (5,77 E - 4 * (-3,05))^2 + \\ & (0,29 * 1,98 E - 5)^2 + ((1,30 E - 6) * 2,80)^2 + (2,89 E - 6 * (-4,01))^2 + \\ & (0,05 * (3,66E - 5))^2 \end{aligned}}$$

$$u_{balon} = 0,001$$

2. Calculando la Incertidumbre a partir de la tolerancia del balón según el fabricante, utilizando la Ec.61.

$$u = \frac{0,015}{\sqrt{6}} = 0,006$$

3. Se determina la incertidumbre del balón, combinando las dos incertidumbres

$$u_{balon\ 2,00\ mL} = \sqrt{(0,001)^2 + (0,006)^2}$$

$$u_{balon\ 2,00\ mL} = 0,006$$

Reportándose con una incertidumbre expandida (U), utilizando la ec.36.

$$U = (0,006)(2)$$

$$U = 0,01$$

La incertidumbre del balón de 2,00 mL se expresó:

$$2,01 \pm 0,01\ mL$$

De esta misma manera se realizó los cálculos para determinar la incertidumbre expandida en las demás materiales (matraces volumétricos, pipetas y micropipetas) utilizados en este estudio.

4.3. Preparación de soluciones, soluciones intermedias y soluciones trabajo

Como se ha mencionado anteriormente se prepararon distintas soluciones estándares para determinar la Fracción Media de HTP en estudio.

A continuación presentamos el ejemplo de los cálculos realizados para la fracción DRO, para las fracción PAH's se presentan en *Anexo 15*. Los cálculos para el material de referencia (Solución de Combustible Diésel) se muestran en *Anexo 16*.

Preparación de la solución Intermedia:

Se realizó a partir del estándar puro utilizando la ecuación de la dilución (*ec.2*), para determinar la concentración (C_2) que es la concentración de la solución intermedia.

Sustituyendo *Ec.2*:

$$C_2 = \frac{(c_1)(v_1)}{v_2} \rightarrow C_2 = \frac{\left(\frac{16044\text{mg}}{\text{L}}\right)(1,00 \text{ mL})}{25,00 \text{ mL}} = 641,76 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Preparación de la solución de trabajo:

La solución de trabajo se preparó a partir de la solución intermedia utilizando la misma *Ec.2* obtenemos.

$$V_1 = \frac{(5,00\text{mL})(320,00\text{ppm})}{641,76\text{ppm}} = 2,5\text{mL}$$

Se tomaron 2,5mL de la solución intermedia DRO a 641,76 mg/L, para preparar la mezcla de trabajo a una concentración de 320,00 ng/ μ L.

Preparación de la solución del estándar:

La solución del estándar de trabajo se preparó a partir de la solución de trabajo utilizando la misma ec.2 obtenemos:

$$C_1 = \frac{(0,30 \text{ mL})(320,00 \text{ ppm})}{1,00 \text{ mL}} = 96,00 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Se tomaron 0,30 mL de la solución trabajo DRO a 320,00 ng/ μ L, para preparar el estándar de trabajo a una concentración de 96,00 ng/ μ L.

4.3.1. Estimación de la incertidumbre en la preparación de las soluciones

4.3.1.1. Incertidumbre de la solución intermedia

En la incertidumbre de la solución intermedia para la fracción DRO se ocupa la incertidumbre del estándar puro, esta es proporcionada por el fabricante a un nivel de confianza del 95% el cual es igual a $\pm 80 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$. Esta incertidumbre asignada es dividida por el multiplicador y la varianza estimada a un nivel de confianza del 95% que corresponde a 1,96. (Ver tabla en Anexo 22), para la determinación de la incertidumbre estándar (Chacón, S., 2004).

Los cálculos de la incertidumbre en la preparación de las soluciones de la fracción PAH's se muestran en Anexo 17, y los del material de referencia se muestran en Anexo 18.

La incertidumbre de la solución intermedia se calcula usando la ec.37.

$$u_{ci} = \sqrt{\left(\left(\frac{80}{1,96}\right) * 0,04\right)^2 + (0,003 * 641,76)^2 + (0,03 * (-25,67))^2}$$

$$u_{ci} = 2,64$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre del estándar puro (u_{cp}) = es el cociente de la incertidumbre proporcionada por el fabricante y la varianza estimada al 95%.
- Incertidumbre en el volumen tomado del estándar puro (u_{vp}), para preparar la solución intermedia y que es equivalente a la incertidumbre de la pipeta utilizada en la medición de este volumen: pipeta 1 mL

- El volumen preparado de solución intermedia (v_i) = 25,00 mL
- Incertidumbre en el volumen preparado (u_{v_i}), balón de 25,00 mL
- Concentración de la solución intermedia (C_i) 641,76 ng/ μ L

Reportándose con una incertidumbre expandida (U), utilizando la ec.36:

$$U = (2,64)(2)$$

$$U = 5,28$$

Cálculo de los coeficientes de sensibilidad

- Coeficiente de sensibilidad del volumen tomado del estándar puro.

Sustituyendo ec.38.

$$\frac{\partial}{\partial V_p} = \frac{16044,00}{25,00} = 641,76$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar puro.

Sustituyendo ec.39.

$$\frac{\partial}{\partial C_p} = \frac{1,00}{25,00} = 0,04$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución Intermedia.

Sustituyendo la ecuación ec.40.

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = -\frac{1,00 * 16044,00}{25,00^2} = -25,67$$

A continuación se muestran las concentraciones de las soluciones intermedias con sus incertidumbres asociados.

Tabla 12

Concentraciones intermedias con sus incertidumbres asociadas

Estándar	Concentración
DRO Mixture	641,76 ± 5,28 ng/μL
PAH'S Mixture	681,72 ± 5,53 ng/μL
Solución de Combustible Diésel (MR)	1002,7 ± 8,15 ng/μL

4.3.1.2. Incertidumbre de la solución trabajo

Utilizando la ec.41. Planteada de la siguiente manera:

$$u_{sol. trabajo} = \sqrt{(2,64 * 0,50)^2 + (0,01 * 256,70)^2 + (0,01 * (-64,18))^2}$$

$$u_{sol. trabajo} = 2,96$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre en la solución Intermedia (u_{Ci}) = 2,64 (Cálculo realizado en el inciso anterior)
- Incertidumbre del volumen tomado (u_{v_i}): pipeta 2,50 mL
- El volumen preparado de solución trabajo (u_{v_t}): = 5,00mL

Reportándose con una incertidumbre expandida (U), utilizando la ec.36:

$$U = (2,96)(2)$$

$$U = 5,92$$

Coefficientes de sensibilidad

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución intermedia

Sustituyendo ec. 42.

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = \frac{641,76}{2,50} = 256,70$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de la solución intermedia

Sustituyendo *ec.43*.

$$\frac{\partial}{\partial C_i} = \frac{2,50}{5,00} = 0,5$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución trabajo

Sustituyendo *ec.44*.

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = -\frac{2,50 * 641,76}{5,00^2} = -64,17$$

A continuación se muestran las concentraciones de las soluciones trabajo con su incertidumbre asociada:

Tabla 13

Concentraciones de trabajo con sus incertidumbres asociadas

Estándar	Concentración
DRO Mixture	320,00 ± 5,92 ng/μL
PAH'S Mixture	340,00 ± 4,12 ng/μL
<i>Solución de Combustible Diésel (MR)</i>	100,27 ± 1,03 ng/μL

4.3.1.3. Incertidumbre del estándar de trabajo

La incertidumbre del estándar de trabajo se realizó sustituyendo *ec.45*.

$$u_{C_{std}} = \sqrt{(2,96 * 0,30)^2 + (0,001 * 320,00)^2 + (0,004 * (-96))^2}$$

$$u_{C_{std}} = 1,02$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre en la solución de trabajo (u_{ct}) = 2,96 (Cálculo realizado en el inciso anterior)
- Incertidumbre del volumen tomado de la solución de trabajo (u_{vt}): micropipeta 300,00 μ L.
- Incertidumbre del volumen preparado de la solución del estándar (u_{vstd}): = balón 1,00 mL
- Reportándose con una incertidumbre expandida (U), utilizando la ec.36:

$$U = (1,02)(2)$$

$$U = 2,04$$

Cálculo de los coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de trabajo

Sustituyendo ec.46.

$$\frac{\partial}{\partial c_t} = \frac{0,30}{1,00} = 0,30$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución de trabajo

Sustituyendo ec.47.

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = \frac{320,00}{1,00} = 320,00$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución del estándar.

Sustituyendo ec.48.

$$\frac{\partial}{\partial V_{std}} = -\frac{320,00 \cdot 0,30}{1,00^2} = -96,00$$

4.4. Estimación de la incertidumbre del método analítico

Se determinó las principales fuentes de incertidumbre de los resultados del proceso analítico. En la *Tabla 14*, se presentan las concentraciones de las muestras fortificadas con el material de referencia (Solución de Combustible Diésel) procesadas con su valor de incertidumbre expandida asociada.

Tabla 14

Muestras fortificadas por el material de referencia (Solución de Combustible Diésel)

N°	Concentración
1	78,34 ± 1,66 ng/mL
2	78,22 ± 1,64 ng/mL
3	75,26 ± 1,60 ng/mL
4	93,76 ± 1,70 ng/mL
5	89,66 ± 1,66 ng/mL
6	89,50 ± 1,66 ng/mL
7	88,35 ± 1,62 ng/mL
8	91,25 ± 1,68 ng/mL
9	92,17 ± 1,70 ng/mL
10	100,63 ± 1,84 ng/mL

A continuación se muestra un ejemplo del cálculo matemático que se realizó para determinar la incertidumbre de las concentraciones recuperadas. (Ejemplo para la concentración N° 1).

4.4.1. Incertidumbre del área de la muestra

Para determinar la incertidumbre del área de la muestra, se calculó la incertidumbre de la respuesta del sistema y la jeringa del sistema.

Incertidumbre de la respuesta del sistema:

La incertidumbre de la respuesta del sistema se calculó sustituyendo los datos presentados en la *Tabla 15*.

Tabla 15

Muestras fortificadas para la respuesta del sistema

N°	Áreas
1	3297847,81
2	3280151,02
3	3270415,44
4	3265136,06
5	3206319,99
6	3322213,22
promedio	3273680,59
Desviación estándar	38993,48

Sustituyendo ec.61.

$$u = \frac{38993,48}{\sqrt{6}} = 15919,02$$

Jeringa del sistema:

La incertidumbre de la jeringa del sistema se determinó sustituyendo la tolerancia provista por el fabricante

Sustituyendo ec.56.

$$u = \frac{1\%}{\sqrt{3}} = 0,58 \%$$

Luego se aplicó una regla de tres, para determinar la incertidumbre en microlitros:

$$u(\mu L) = \frac{u(\%) * V(\text{inyeccion})}{100\%} = \frac{0,58\% * 2,00 \mu L}{100\%} = 0,01 \mu L$$

Después de calcular la incertidumbre de la respuesta de sistema y la jeringa del sistema, se calculó la incertidumbre del área de la muestra, haciendo uso de la ec.54 que es la combinación de las incertidumbres calculadas.

Sustituyendo ecuación:

$$u_{A \text{ muestra}} = \sqrt{(15919,02)^2 + (0,01)^2} = 15919,02$$

4.4.2. Incertidumbre del factor de respuesta

El factor de respuesta se calcula dividiendo el área del estándar entre la concentración del estándar, como se muestra a continuación:

Sustituyendo ec.57.

$$R_f = \frac{6123775,01}{96,00} = 63789,32$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Área del estándar (A_{std}) = es el área del estándar (respuesta) a 96,00 ng/mL
- Concentración del estándar ($[std]$) = es la concentración que fue preparado el estándar de trabajo (96 ng/mL). Ver *Cap. 4, Inciso 4.3.1.3*

La incertidumbre del factor de respuesta se determinó sustituyendo la ec.58:

$$uR_f = \sqrt{(15919,02 * 0,01)^2 + (1,00 * -715,56)^2} = 734,52$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre del área del estándar ($u_{A_{std}}$) = es la incertidumbre de la respuesta del sistema. Ver *cap. 4, Inciso 4.4.1*
- Incertidumbre de la concentración del estándar ($u[std]$) = es la incertidumbre del estándar (96 ng/mL).

Coefficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para el área del estándar

Sustituyendo la *ec.59*:

$$\frac{\partial}{\partial A_{std}} = \frac{1,00}{96,00} = 0,01$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar

Sustituyendo la *ec.60*:

$$\frac{\partial}{\partial [std]} = -\frac{6594583,05}{(96,00)^2} = -715,56$$

4.4.3. Incertidumbre de volumen de la Muestra

La incertidumbre del volumen de la muestra se determinó:

Sustituyendo *ec.61*:

$$u = \frac{6,00 \text{ mL}}{\sqrt{6}} = 2,45 \text{ mL}$$

Después de haber calculado las incertidumbres de todos los componentes de la *ec.49*, se procedió a sustituirlos. Sustituyendo ecuación:

$$u_{cmf} = \sqrt{(15919,02 * 1,57E - 5)^2 + (4,00 * 0,06)^2 + (734,52 * -9,93E - 4)^2 + (2,45 * -0,06)^2} = 0,83 \text{ ng/mL}$$

Valor que debemos tener en cuenta:

- u_{VAforo} = Es la incertidumbre del matraz de aforo de 1 mL (multiplicado por 1000 para pasar a unidades de μL).

Coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para el área de la muestra

Sustituyendo ec.50:

$$\frac{\partial}{\partial CA_{muestra}} = \frac{1000,00}{63789,32 * 1000,00} = 1,57E - 5$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de aforo

Sustituyendo ec.51:

$$\frac{\partial}{\partial C_{VAforo}} = \frac{4039778,96}{63789,32 * 1000,00} = 0,06$$

- Coeficiente de sensibilidad para el factor de respuesta

Sustituyendo ec.52:

$$\frac{\partial}{\partial CR_f} = -\frac{4039778,96 * 1000,00}{63789,32^2 * 1000,00} = -9,93E - 4$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la muestra

Sustituyendo la ec.53:

$$\frac{\partial}{\partial C_{Vmuestra}} = -\frac{4039778,96 * 1000,00}{63789,32 * 1000,00^2} = -0,06$$

Reportándose con una incertidumbre expandida (U), utilizando la ec.36:

$$U = (0,83)(2)$$

$$U = 1,66$$

4.5. Determinación de los parámetros de validación

4.5.1. Exactitud

Se evaluó mediante la veracidad; se determinó por medio del sesgo haciendo uso de la ec.5, a partir de los datos presentados en la siguiente tabla:

Tabla 16

Concentraciones de muestras fortificadas con su incertidumbre expandida asociada

N°	Concentraciones
1	75,26 ± 1,61 ng/mL
2	93,76 ± 1,70 ng/mL
3	89,66 ± 1,66 ng/mL
4	89,50 ± 1,66 ng/mL
5	91,25 ± 1,68 ng/mL
6	100,63 ± 1,84 ng/mL

Sustituyendo ec.5:

$$S = 90,85 - 98,97 = -8,12$$

El signo negativo en el cálculo del sesgo nos indica que las mediciones de nuestros resultados están por debajo del valor asumido como verdadero.

Al promedio de las concentraciones se le sumo, el promedio de sus incertidumbres combinadas. Luego se aplicó el contraste de significación comparación de una media experimental con un valor conocido, que prueba la veracidad de una hipótesis nula, denotada H_0 que refiere entonces a decir si existe diferencia significativa entre \bar{X} y μ (Miller, J., y Miller, J., 2002), lo que nos ayudó a destacar la existencia de errores sistemáticos sujetos al método analítico. El cálculo estadístico “t” está dado por:

Sustituyendo ec.6:

$$|t_{calculado}| = \frac{(90,85-98,97)}{\frac{8,36}{\sqrt{6}}} = 2,38$$

Dado que el valor de $t_{calculado} < t_{crítico}$ y en la tabla el valor de $t_{5=2,78}$ ($p=0,05$), la hipótesis nula se retiene no existe diferencia significativa entre los valores encontrados con respecto al valor tomado como verdadero, se puede decir entonces que no hay evidencia de error sistemático y que el método analítico es exacto, sin embargo no significa que este tipo de error no exista, si no que no se ha podido constatar su evidencia.

Para la fracción PAH's no se determinó este parámetro, debido a que el material de referencia utilizado, no se encontraron trazas cuantificables.

4.5.2. Precisión

La evaluación de la precisión se realizó utilizando los datos de la *Tabla 17*.

Precisión a partir de repetibilidad, ejemplo presentado para la fracción DRO (Ver *Anexo 8*, para datos de la fracción PAH's)

Tabla 17

Muestras fortificadas

N° Muestras	Concentración adicionada (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL) Sustituyendo ec.3.			% de recobro (%r) Sustituyendo ec.4.		
1	80	64,39	64,50	65,16	80,49	80,62	81,46
2	96	71,97	74,32	75,85	74,97	77,41	79,01
3	112	84,31	85,53	88,72	75,28	76,37	79,21

Haciendo uso de la ec.7, se calculó el cuadrado medio entre muestras y utilizando la ec.8 se determinó el cuadrado medio dentro de muestras. En la siguiente tabla se presenta el procedimiento para análisis de varianzas por el método de ANOVA:

Tabla 18.

Suma de cuadrados y grados de libertad

N° muestras	Promedio del %r (P%r)	(%r-P%r) ²		$\Sigma(X_{ij} - \bar{X})^2$ $\Sigma(\%r - P\%r)^2$	ΣT_i ($\Sigma \%r$)	ΣT_i^2 ($\Sigma \%r^2$)
1	80,86	0,13	0,05	0,36	0,55	242,57
2	77,13	4,66	0,08	3,52	8,26	231,39
3	76,95	2,80	0,34	5,09	8,23	230,86
Promedio	78,31					
Desviación estándar	2,20	n=3, h=3, N=9		Σ	17,05	704,81
Fuente de variación		Suma de cuadrados		Grados de libertad		Cuadrado medio
Entre muestras		(165674,82/3)- ((704,81)²/9)=29,15		2		29,15/2=14,58
Dentro de muestras		17,05		6		17,05/6=2,84

Seguidamente con las varianzas obtenidas, se aplicó el estadístico de prueba de F:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} = \frac{14,58}{2,84} = 5,13$$

Dado que el valor de $F_{calculado} < F_{crítico} (F_{2, 6=5, 143; P=0,05})$, por tal razón se retiene la hipótesis nula, es decir, no existe diferencia significativa entre las varianzas, por ende los dos conjuntos de resultados presentan repetibilidades similares, con esto se confirma que el método analítico es preciso para la fracción DRO.

De igual manera se realizó el procedimiento anterior para la fracción PAH's (Ver *Anexo 8*), obteniendo un valor de $F_{calculado} (23,62) > F_{critico} (F_{2, 6=5, 143; P=0,05})$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, es decir existe diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto el método analítico no es preciso para la fracción PAH's.

Finalmente se calculó el coeficiente de variación, sustituyendo la ec.9:

$$Cv_{y/x} = \frac{2,20}{78,31} * 100\% = 2,81\%$$

El coeficiente de variación calculado es $< 5\%$, cumpliendo el criterio de decisión según la política establecida en la ONA (ONA, 2012).

4.5.3. Sensibilidad

La sensibilidad se determinó mediante la pendiente de la curva de calibración (la curva preparada en la linealidad del sistema(instrumento)) ver *Tabla 7 en cap. 3, sección 3.2.3*, la cual consistió en un juego de 6 estándares a diferentes niveles de concentración tanto para la fracción DRO y para la fracción PAH's. Ver gráficas en *Anexo 22 y Anexo 23*.

4.5.4. Límite de Detección (LD) y Limite de Cuantificación (LC)

En la siguiente tabla se presenta el ejemplo para el tratamiento estadístico utilizado en el cálculo del límite de detección y cuantificación del sistema (Instrumento) para la fracción DRO, sustituyendo los datos para las ecuaciones correspondientes.

Tabla 19

Tratamiento estadístico para la determinación de LD y LC del sistema (instrumento)

Nivel Muestras	Abcisas Xi concentración (ng/mL)	Ordenadas Yi áreas	XY	X ²	Y ²
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	16,00	1328893,81	21262301,01	256,00	1,77E+12
3	32,00	2353097,48	75299119,36	1024,00	5,54E+12
4	64,00	4651584,54	297701410,37	4096,00	2,16E+13
5	96,00	6594583,05	633079972,51	9216,00	4,35E+13
6	128,00	9560049,44	633079972,51	16384,00	9,14E+13
7	160,00	12531025,5	2004964092,8	25600,00	1,57E+14
Σ	496,00	37019233,8	4255993223,9	56576,00	3,21E+14
promedio	70,86	5288461,98	S_{xx}=21430,86	S_{yy}=1,25E+1	S_{xy}=163291607
S_{xy}²=2,67E+1	S_y=362133,1	b= 76194,62	LD= 7,50	LC= 14,52	S_{xy}=163291607
8	2		ng/mL	ng/mL	9

• *t_s= 2,57; valor tomado de la tabla de student, a un grado de confianza del 95% y n-2 grados de libertad.*

De la misma manera se calcularon los límites de detección y cuantificación del sistema (instrumento) para la fracción PAH's (ver Anexo 9), obteniendo:

- LD=10,07 ng/mL
- LC=19,32 ng/mL

Luego se realizó la suma de los límites de detección y cuantificación de ambas fracciones, que corresponden a los límites de detección y cuantificación del sistema (instrumento) para la fracción media de HTP en agua, obteniendo para el LD el valor de: 17,57 ng/mL y para el LC: 33,84 ng/mL.

Para determinar el límite de detección y cuantificación del método para la fracción DRO se utilizó la ec. 10, sustituyendo los datos presentados en la siguiente tabla:

Tabla 20

Blanco matriz

N°	Áreas
1	1286479,74
2	1378397,34
3	1087833,16
4	1693923,52
5	1728836,72
6	1697235,04
7	1098489,88
8	1119361,69
9	1116212,46
10	1140876,58
S_{blanco}	272532,35
Y_{blanco}	1334764,61
b	76194,62
* S_{blanco} = se realizó mediante la ecuación de la desviación estándar.	
* La pendiente se calculó mediante la ecuación de la recta.	

Sustituyendo ecuación para el LD:

$$LD = \frac{1334764,61 + 3 * 272532,35}{76194,62} = 28,25 \text{ ng/mL}$$

Sustituyendo ecuación para el LC:

$$LC = \frac{1334764,61 + 10 * 272532,35}{76194,62} = 53,28 \text{ ng/mL}$$

De la misma manera se calcularon los límites de detección y cuantificación para la fracción PAH's (ver Anexo 10), obteniendo:

- LD= 4,93 ng/mL
- LC= 7,43 ng/mL

Luego se realizó la suma de los límites de detección y cuantificación de ambas fracciones, que corresponden a los límites de detección y cuantificación del método para la fracción media de HTP en agua, obteniendo para el LD el valor de: 33,18 ng/mL y para el LC: 60,72 ng/mL.

4.5.5. Linealidad del método y Rango

En la siguiente tabla se muestra el ejemplo del tratamiento estadístico utilizado para el cálculo de r , r^2 , b , a , S_b y S_a correspondiente a la fracción DRO para determinar la linealidad, sustituyendo los datos para las ecuaciones correspondientes. Ver grafica en Anexo 24.

Tabla 21

Tratamiento estadístico para el cálculo de r , r^2 , b , a , S_b y S_a

Muestras	Abcisas Xi cantidad adicionada (ng/mL)		Ordenadas Yi cantidad recuperada (ng/mL) Sustituyendo Ec.4.	% recobro Sustituyendo Ec. 3	XY	X ²	Y ²
1	80%	80,00	64,68	80,86	5174,77	6400,00	4184,10
2	100%	96,00	74,04	77,13	7108,23	9216,00	5482,52
3	120%	112,00	86,19	76,95	9652,97	12544,00	742823,00
Σ		288,00	224,92		2193596	28160,00	17094,85
promedio		96,00	74,97		S_{xx}=512,00	S_{yy}=232,47	S_{xy}=344,04
S_b=0,05		S_a=4,87				± IC(a)_{95%}=	± IC(b)_{95%}=
				r²=0,994	r=0,997	13,	0,6
						a=10,46	b=0,67
		S_{xy}²=118364,50	S_y=1,14				

Seguidamente se aplicó la prueba estadística de t-student para comprobar la linealidad del método a partir de los resultados obtenidos anteriormente. En la *Tabla 22*, se muestra la sustitución de las ecuaciones 10,11 y 12.

Tabla 22

Prueba estadística de t-student para r, b y a

Contraste estadístico de t-student		
r	b	a
$t = \frac{[0,997]\sqrt{(1)}}{\sqrt{1 - 0,994}} = 13,38$	$t_{calculado} = \frac{ 0,67 }{0,05} = 13,38$	$t_{calculado} = \frac{ 10,46 }{4,87} = 2,15$
Criterios de Decisión		
Debido que el $t_{calculado} > t_{Crítico}$ ($p=0,05$, $t_1=12,75$) para r y b , se retiene la H₀ concluyendo que la linealidad es adecuada por ende la pendiente es adecuada.		Debido a que el valor $t_{calculado} < t_{Crítico}$ ($p=0,05$, $t_1=12,75$) la H₀ se acepta concluyendo que el efecto de fondo de la cantidad adicionada sobre la cantidad recuperada no es significativo y la linealidad es válida.

Por último se determinó el coeficiente de variación del porcentaje de recobro sustituyendo la ec.9:

$$Cv_{y/x} = \frac{2,40}{78,31} * 100\% = 3,06\%$$

De igual forma se realizó el cálculo y el procedimiento estadístico para la fracción PAH's (*Anexo 13*), obteniendo un $Cv_{y/x} = 3,12\%$ mayor al 2% y consiguiendo que la H_0 se retiene para "r" y "b" pero para "a" la H_0 se rechaza, por lo tanto la linealidad del método analítico en estudio no es válida para esta fracción.

4.5.6. Linealidad del sistema

En la siguiente tabla se presenta el intervalo o rango en el que se trabajó para la determinación de la linealidad del sistema para la fracción DRO, sustituyendo los datos para las ecuaciones correspondientes y así calcular el valor del coeficiente de determinación (r^2) y del coeficiente de correlación (r). Ver grafica *Anexo 23*.

Tabla 23

Intervalo para la linealidad del sistema (instrumento)

N°	Niveles Xi (ng/μL)	Abcisas Yi área	Promedio (Yi)	XY	X ²	Y ²
		1326579,89				
1	16,00	1445134,87	1328893,81	21262301,01	256,00	1,77E+12
		1214966,68				
		2477975,49				
2	32,00	2389199,35	2353097,48	75299119,36	1024,00	5,54E+12
		2192117,60				
		4060390,39				
3	64,00	4817653,72	4651584,54	297701410,37	4096,00	2,16E+13
		5076709,50				
		7111860,13				
4	96,00	6123775,01	6594583,05	633079972,51	9216,00	4,35E+13
		6548114,00				
		9520779,67				
5	128,00	9065077,56	9560049,44	1223686327,94	16384,00	9,14E+13
		10094291,08				
		12722608,08				
6	160,00	12481378,28	12531025,58	2,005E+09	25600,00	1,57E+14
		12389090,37				
Σ	496,00		37019233,89	4255993224	56576,00	3,21E+14
promedio	82,67		6169872,32	S_{xx}=15573,33	S_{yy}=9,24E+13	S_{xy}=119573655 5
r=0,997		r²=0,99	S_{xy}² = 1,43E+18	± IC(b)_{95%}= 8883,61	S_y = 398782,16	S_b = 3195,54

Luego se aplicó la prueba estadística de t-student para demostrar si la correlación a partir de la respuesta de medición de las soluciones de calibración es realmente significativa es decir, si la relación es lineal, lo cual correspondería a la H_0 .

Sustituyendo *ec. 11*:

$$t = \frac{[0,997]\sqrt{(4)}}{\sqrt{1 - 0,993}} = 24,03$$

Debido que el $t_{calculado} > t_{critico}$ ($p=0,05$, $t_4=2,78$) para r , se retiene la H_0 concluyendo que la linealidad es adecuada, es decir los datos se ajustan a la recta. De igual manera se realizó el cálculo y el procedimiento estadístico para la fracción PAH's (*Anexo 14*), obteniendo el mismo resultado, ver grafica en *Anexo 22*.



CAPITULO V

5.1. Conclusión

- A través del estudio se establecieron los parámetros de selectividad/especificidad, sensibilidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud, precisión, linealidad o intervalo de trabajo y rango del procedimiento de ensayo para la determinación de la fracción media de HTP en agua.
- Al comparar los resultados obtenidos con los criterios de aceptación establecidos según la política de la oficina nacional de acreditación (ONA), estos son satisfactorios lo que permite concluir que el método presenta un buen desempeño en el análisis de la fracción DRO.
- Al comparar los resultados obtenidos para la fracción PAH's con los criterios de aceptación establecidos según la Política de la Oficina Nacional de Acreditación (ONA), estos no son satisfactorios, es decir la metodología analítica no presenta un buen desempeño para el análisis de esta fracción. Así mismo se comprobó que el material de referencia (Solución de Combustible Diésel) utilizado, no era el adecuado para el desempeño de esta fracción.

5.2. Recomendaciones

- Optimizar el método analítico utilizando la técnica instrumental de cromatografía de gases con detector MASA (GC-MS), lo que permitirá analizar y cuantificar con un alto grado de satisfactoriedad los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
- Contar con un material de referencia adecuado para la optimización del método analítico desarrollado en el laboratorio de contaminantes orgánico del CIRA/UNAN-Managua para determinar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
- Evaluar los parámetros de validación y la incertidumbre utilizando la metodología analítica para determinar la fracción media de hidrocarburos totales de petróleo en muestras provenientes de agua residuales, domesticas, industriales y agropecuarias.

5.3. Referencias

- CENAM . (2005). *Guía Eurachem*. Obtenido de Metodos analiticos adecuados a su proposito. Guía de Laboratorio para la Validación de Metodos y Temas Relacionados.: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/131037/mod_resource/content/1/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf
- Chacon, J. (2004). *prácticas recomendadas para determinar y reportar la incertidumbre de las mediciones en química analítica* (1 ed.). San Jose, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- CIRA/UNAN-Managua. (13 de 2013). Procedimiento para el lavado de cristaleria utilizado en el análisis de compuestos orgánicos PON-MP-CG-GEN-005., Revisión N 1. *Manual de Procedimiento Operativos del Aseguramiento y Control de la Calidad del Laboratorio de Contaminantes Orgánicos MPOACCL-CO-02*. Managua, Nicaragua .
- Cortes, R. (s.f). *Universidad de las Americas Pueblas*. Obtenido de http://caterina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/cortes_r_jh/capitulo0.pdf
- Crubrellati, R. (2009). *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en mediciones químicas* (Vol. 1). Buenos Aires: Ciencia y tecnología para el desarrollo.
- Ellison, s., y Willans, A. (2012). *Guía Eurachem/CITAC*. Obtenido de Cuantificación de la Incertidumbre en las medidas Analíticas: http://www.citac.cc/QUAM2012_P1_ES.pdf
- EPA. (2003). *Method 8015D. Nonhalogenated organics using CG/FID*.
- Estrella, I., & Guevara, P. (2011). Analisis de hidrocarburos de petroleo en agua mediante cromatografia de gases (Tesis de postgrado). Universidad de las fuerzas armadas ESPE, Ecuador.
- Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores. (2016). *Guía Eurachem*. Obtenido de La edecucion al uso de los metodos analiticos. Una guia de laboratorio para validacion de metodos y temas relacionados: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf




- Guerrero, M., & Herrera, J. (2014). Desarrollo y evaluación de un método analítico multi residuo para determinar plaguicidas organofosforados y cipermetrina en tomate (*Solanum lycopersicum*), utilizando la técnica de cromatografía de gases. (Tesis de grado). *Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua*. Managua.
- Instituto de salud pública de Chile. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*. Obtenido de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf
- Meier, P., y Zund, R. (2000). *Statistical Methods in Analytical Chemistry* (2da ed., Vol. 153). Canadá: JOHN WILEY & SONS, INC.
- Miller, J., y Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para química analítica*. Madrid, España: Pearson Educación. S.A.
- Montoya, S., & Páez, C. (2012). Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales (Trabajo de grado). *Universidad Tecnológica de Pereira*. Colombia.
- NTN. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- ONA. (2012). *Política para la validación de métodos de laboratorios*. Obtenido de http://www.mific.gob.ni/Portals/0/Documentos%20DNM/ACREDITACION/SOLICITU%20ODE%20ACREDITACION/LAB_ENS_CALIB/2014_03_07/DOC_ONA_12_011_Ver%5B1%5D_Rev%5B0%5D.pdf
- Prieto, V., y Martínez, A. (1999). La contaminación de las aguas por hidrocarburos: un enfoque para abordar su estudio. *Revista cubana de Higiene y epidemiología*, 37(1), 13-20.
- Quintero, C. (2013). Estandarización, validación determinación de la trazabilidad y estimación de la incertidumbre de medición del método de extracción Soxhlet para la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en aguas residuales. (Tesis de grado). *Universidad Tecnológica de Pereira*. Colombia.

- Reglamento en el que se establecen las disposiciones para el vertido de aguas residuales. (30 de Noviembre de 2017). *La Gaceta*, págs. 10645-10661.
- Rodríguez, G., y Blanco, R. (2001). Aseguramiento de la calidad analítica y norma ISO 17 025. *Rev. costarric. cienc. méd*, 22(1-2).
- Ron, K. (2012). Determinación de residuos de hidrocarburos totales de petróleo (fracción diesel) en aguas de la reserva de producción faunística cuyabeno, mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (Tesis de grado). *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Ecuador.
- Santa, J., Serrano, M., y Stashenko, E. (2002). Analisis comparativo de diferentes metodos de extraccion de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 2(3), 49-60.
- Séamus, P., y Higson, J. (2007). *Química analítica*. Mexico: Mc Graw Hill.
- Shewhart., W. (1986). *Statistical Method from the Viewpoint of uality Control* (Vol. 2). New York: Dover Publication.
- Trujillo, S., y Arias, R. (Diciembre de 2002). *CENAM*. Obtenido de Incertidumbre en la calibración de un matraz volumétrico. Centro Nacional de Metrología: <http://www.cenam.mx>
- Válcarcel, M. y Gómez, A. (1998). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté, S.A. Obtenido de <https://books.google.com.ni/books?id=WPYYF75dejsC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>



CAPITULO VI

CERTIFICADO DE CALIBRACION DEL HIDROMETRO



Calibration complies with ISO/IEC 17025, ANSI/NCSL Z540-1, and 9001


Cert. No.: 4040-7610814

Traceable® Certificate of Calibration for Therm./Clock/Humidity Monitor

Manufactured for and distributed by: Fisher Scientific, 300 Industry Drive, Pittsburgh, PA 15275-1001

Instrument Identification:

Model Numbers: 06-662-4, 11725843 S/N: 160395192 Manufacturer: Control Company

Standards/Equipment:

Description	Serial Number	Due Date	NIST Traceable Reference
Chilled Mirror Hygrometer	31574/H2049MCR	10/12/16	13366
Digital Thermometer	221197993	10/01/16	4000-7091904
Non-Contact Frequency Counter	26.66879	6/15/16	1006376111

Certificate Information:

Technician: 104 Procedure: CAL-17 Cal Date: 4/25/16 Due Date: 4/25/18
 Test Conditions: 24.5°C 46.0 %RH 1011 mBar

Calibration Data: (New Instrument)

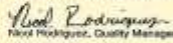

Unit(s)	Nominal	As Found	In Tol	Nominal	As Left	In Tol	Min	Max	±U	TU/R
°C		N.A.		24.05	24.2	Y	23.1	25.1	0.059	>4:1
%RH		N.A.		44.31	47	Y	39	49	1.3	3.8:1
Sec/24hr		N.A.		0.006	-0.767	Y	-8.640	8.640	0.13	>4:1

This instrument was calibrated in compliance with ISO/IEC 17025:2005 and ANSI/NCSL Z540-1-1994 Part 1.

A Test Uncertainty Ratio of at least 4:1 is maintained unless otherwise stated and is calculated using the expanded measurement uncertainty. Uncertainty evaluation includes the instrument under test and is calculated in accordance with the ISO "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" (GUM). The uncertainty represents an expanded uncertainty using a coverage factor k=2 to approximate a 95% confidence level. In tolerance conditions are based on test results falling within specified limits with its resolution by the uncertainty of the measurement. The results contained herein relate only to the item calibrated. This certificate shall not be reproduced except in full, without written approval of Control Company.

The calibration results published in this certificate were obtained using equipment capable of producing results that are traceable to NIST and through NIST to the International System of Units (SI).

Nominal-Standard's Reading: As Left-Instrument's Reading: In Tol-In Tolerance: Min/Max-Acceptance Range: ±U-Expanded Measurement Uncertainty: TU/R-Test Uncertainty Ratio: As Found-(Max-Min):2: Min - As Left Nominal(Rounded) - Tolerance: Max - As Left Nominal(Rounded) + Tolerance: Date-MM/DD/YYYY

Noel Rodriguez, Quality Manager Aaron Jackson, Technical Manager

Maintaining Accuracy:

In our opinion once calibrated your Therm./Clock/Humidity Monitor should maintain its accuracy. There is no exact way to determine how long calibration will be maintained. Therm./Clock/Humidity Monitors change little, if any at all, but can be affected by aging, temperature, shock, and contamination.

Recalibration:

This device was calibrated using a single test point. Should additional test points be required, please contact Control Company for factory calibration and re-certification traceable to National Institute of Standards and Technology.

CONTROL COMPANY 4455 Rex Road Friendswood, TX 77546 USA
 Phone 281 482-1714 Fax 281 482-9448 service@control3.com www.control3.com

Control Company is an ISO 17025:2005 Calibration Laboratory Accredited by (ANAB) American Association for Laboratory Accreditation, Certificate No. 1750/01.
 Control Company is ISO 9001:2008 Quality Certified by (DNV) Det Norske Veritas, Certificate No. DNV-01509-2008-02-HOU-PWA.
 International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) - Multilateral Recognition Agreement (MLA).

Page 1 of 1 Traceable® is a registered trademark of Control Company © 2008 Control Company

ANEXO 2

IMÁGENES DEL PROCESO ANALÍTICO



Extracción de Muestras



Reconcentración en N₂



Preparación de soluciones



Rota Evaporador



Columna del Cromatógrafo



Calibración de Material Volumétrico



Pesas para la calibración de la balanza



Soluciones intermedias

ANEXO 3

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE BALANZA ELECTRÓNICA MARCA METTLER-TOLEDO GMBH, MODELO: AE160

km 3,5 carretera Panamericana Norte
 Managua, Nicaragua.
 Teléfono: (505) 2251 - 10577
 e-Mail: lanamet@mific.gob.ni
 http://www.mific.gob.ni/


Laboratorio Nacional de Metrología

CERTIFICADO DE CALIBRACION
Calibration Certificate

Registro: <i>Register</i>	RCB-7324-16	Número de Servicio: <i>Service Number</i>	OP-3414-16-02
	Página <i>Page</i>	1 de <i>of</i>	3 Páginas <i>Pages</i>
Objeto <i>Device</i>	Balanza electrónica		
Marca <i>Manufacturer</i>	Sartorius AG 37075 Göttingen, Alemania		
Modelo <i>Model / Type</i>	TE214S	Número de Serie <i>Serial Number</i>	21810657 Inv: MUMCCEL-CM-04-09
Rango de Calibración <i>Range of Calibration</i>	Máx¹ : 0 g a 200 g	División de Escala <i>Scale Division</i>	0,0001 g e= 0,001 g
Cliente <i>Customer</i>	CIRA UNAN-Managua Semáforos Enitel Villa Fontana 100 m al Norte Managua, Nicaragua.		
Fecha de Calibración <i>Date of Calibration</i>	2016-04-14		

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en esta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión <i>Date of Issue</i>	Calibró <i>Calibrated by</i>	Revisó <i>Revised by</i>
2016-04-19	 Lic. Carlos Morales Responsable de Calibración <i>Person in Charge</i>	 Lic. Gustavo Montiel Director <i>Head of Laboratory</i>



CERTIFICADO DE CALIBRACION
Calibration Certificate



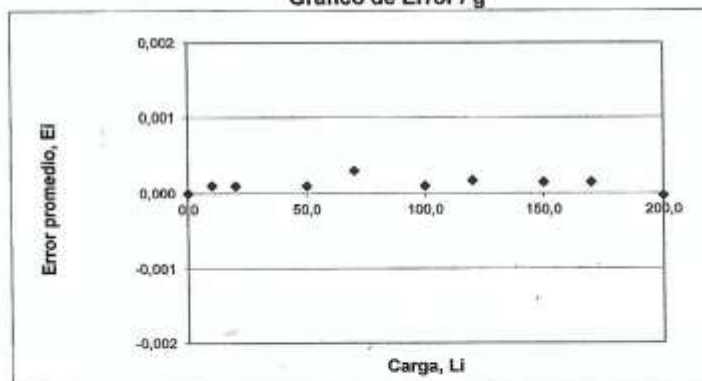
Laboratorio Nacional de Metrología

Registro: RCB-7324-16 Servicio: OP-3414-16-02 Página 2 de 3 Páginas
Register Service Page of Pages

RESULTADOS DE LA CALIBRACION (Calibration Results)

Carga Load	Carga de Prueba, L_i Test Load	Indicación, I_i Indication	Error, E_i Error	Incertidumbre expandida, U_i Uncertainty
L_1	0,00000 g	0,0000 g	0,0000 g	0,0001 g
L_2	10,00000 g	10,0001 g	0,0001 g	0,0001 g
L_3	20,00000 g	20,0001 g	0,0001 g	0,0001 g
L_4	50,00000 g	50,0001 g	0,0001 g	0,0003 g
L_5	70,00000 g	70,0003 g	0,0003 g	0,0004 g
L_6	100,00000 g	100,0001 g	0,0001 g	0,0005 g
L_7	120,00000 g	120,0002 g	0,0002 g	0,0006 g
L_8	150,00000 g	150,0002 g	0,0002 g	0,0008 g
L_9	170,00000 g	170,0002 g	0,0002 g	0,0009 g
L_{10}	200,00000 g	200,0000 g	0,0000 g	0,0010 g

Gráfico de Error / g



Repetibilidad máxima, s 0,0000 g
Repeatability

Excentricidad máxima, $|dI_{ecc}|_{max}$ 0,0006 g
Eccentricity

CERTIFICADO DE CALIBRACION
Calibration Certificate



Laboratorio Nacional de Metrología

Registro: RCB-7324-16 Servicio: OP-3414-16-02 Página 3 de 3 Páginas
Register Service Page of Pages

PROCEDIMIENTO DE LA CALIBRACION (Calibration Method)

El Instrumento para Pesar detallado en la página 1, fue calibrado utilizando el método de comparación contra cargas de prueba discretas las cuales fueron aumentando por pasos con descarga entre los mismos, igual caso para cargas decrecientes de acuerdo a la Guía SIM para la Calibración de Instrumentos para Pesar de Funcionamiento no Automático.

El Instrumento fue ajustado (ajuste de parámetros) antes de realizar la calibración, utilizando el ajuste externo con pesas de trabajo del LANAMET, según el procedimiento de ajuste y operación normal utilizado por el cliente en sus mediciones rutinarias. El instrumento fue calibrado en el Sala Instrumental por solicitud del cliente, el cual fue informado de las posibles consecuencias con respecto a la validez de la calibración si se realiza movimiento del instrumento. Las condiciones ambientales al momento de calibración son las normales en las que el instrumento es utilizado por el cliente.

TRAZABILIDAD (Traceability)

El Laboratorio Nacional de Metrología asegura la trazabilidad de sus mediciones a la unidad básica de masa del Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de los Patrones de Trabajo, Clase E2, con certificado número DKD80716.

INCERTIDUMBRE (Uncertainty)

Las incertidumbres informadas en éste documento fueron calculadas tomando en cuenta las contribuciones de las cargas de prueba, de las indicaciones del instrumento para pesar bajo calibración y los posibles factores de influencia. La incertidumbre expandida reportada es el doble de la incertidumbre combinada (usando un factor $k = 2$ para un intervalo de confianza de aproximadamente el 95%) de acuerdo a la "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements", publicada por ISO a solicitud de BIPM, IEC, IFCC, IUPAC, IUPAP y OIML (1995)

CONDICIONES AMBIENTALES (Environmental Conditions)

Temperatura: $(28,4 \pm 1) ^\circ\text{C}$
Humedad Relativa: $(39 \pm 5) \%$
Presión: $(990 \pm 1) \text{ hPa}$

INDICACIONES PREVIAS A LA CALIBRACIÓN (Test before calibration)

Carga (g)	Indicación (g)
1- 20	19,9994
2- 100	99,9978
3- 200	199,9953

OBSERVACIONES (Observations)

Es responsabilidad del usuario realizar recalibraciones al instrumento en intervalos apropiados. El texto en inglés de éste documento es una traducción del texto en español. En caso de cualquier controversia, debe ser utilizado el texto original en español.

It is responsibility of the user to have the object recalibrated at appropriate intervals. The English version of this document is a translation of the original text. In case of controversy, the spanish original text must be used.

Fin del Documento
End of Document

CALIBRACIÓN DE LA BALANZA

La balanza analítica utilizada en la parte experimental, fue calibrada por el Laboratorio Nacional de Metrología (LANAMET). En el reporte de resultados de la calibración (anexo 11), se presentan los límites de incertidumbre para los diferentes rangos de pesaje y la exactitud de la balanza.

El rango de medición de la balanza analítica marca: Mettler- Toledo GmbH, modelo: AE 160, va de 0 a 160 g, la cual presenta los siguientes resultados de calibración:

Tabla 4

Carga	Carga de prueba L_i	Indicación, I_i	Error, E_i	Incertidumbre expandida, U_i
L ₁	0,0000 g	0,0000 g	0,0000 g	0,0001 g
L ₂	10,0000 g	9,9999 g	-0,0001g	0,0001 g
L ₃	20,0000 g	19,9996 g	-0,0005 g	0,0002 g
L ₄	40,0000 g	39,9992 g	-0,0005 g	0,0003 g
L ₅	50,0000 g	49,9998 g	-0,0002 g	0,0004 g
L ₆	70,0000 g	69,9998 g	-0,0002 g	0,0005 g
L ₇	100,0000 g	99,9997 g	-0,0002 g	0,0007 g
L ₈	120,0000 g	119,9995 g	-0,0004 g	0,0008 g
L ₉	150,0000 g	149,9996 g	-0,0002 g	0,0011 g
L ₁₀	160,0000 g	159,9999 g	0,0002 g	0,0011 g

El laboratorio (LAMANET) certifica que el instrumento de medición arriba detallado ha sido fielmente calibrado. La trazabilidad del laboratorio de metrología asegura la trazabilidad de sus mediciones a la unidad básica de masa del sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de los patrones de trabajo, Clase F1, con certificado número RCIM-0043-09.

ANEXO 5

RESULTADOS PARA LA CALIBRACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO (CLASE A)

Pipetas de constricción de 0,1 mL \approx 100 μ L

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3615	43,4269	0,0654
2	43,3614	43,4264	0,0650
3	43,3615	43,4266	0,0651
4	43,3616	43,4276	0,0660
5	43,3614	43,4274	0,0660
Promedio	43,3615	43,4270	0,07
Desviación estándar	8,3666E-05	0,0005	0,0005
Tolerancia (\pm)	0,09%		
Volumen Real V (mL)	0,10		
Incertidumbre expandida (mL)	0,001		

Pipetas de constricción de 0,2 mL \approx 200 μ L

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3522	43,4844	0,1322
2	43,3523	43,4833	0,1310
3	43,3522	43,4855	0,1333
4	43,3523	43,4873	0,1350
5	43,3523	43,4863	0,134
Promedio	43,3523	43,4854	0,1331
Desviación estándar	5,47E-05	0,0016	0,002
Tolerancia (\pm)	0,09%		
Volumen Real V (mL)	0,20		
Incertidumbre expandida (mL)	0,002		

Pipetas de constricción de 0,25 mL \approx 250 μ L

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3503	43,5135	0,1632
2	43,3502	43,5142	0,1640
3	43,3501	43,5164	0,1663
4	43,3500	43,5170	0,1670
5	43,3500	43,5170	0,1670
Promedio	43,3501	43,5156	0,1655
Desviación estándar	0,00013	0,0017	0,002
Tolerancia (\pm)	0,09%		
Volumen Real V (mL)	0,25		
Incertidumbre expandida (mL)	0,002		

Pipetas de constricción de 0,3 mL \approx 300 μ L

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3787	43,5781	0,1994
2	43,3788	43,5778	0,1990
3	43,3787	43,5766	0,1979
4	43,3788	43,5778	0,1990
5	43,3787	43,5777	0,1990
Promedio	43,3523	43,5776	0,1989
Desviación estándar	5,47E-05	0,0006	0,001
Tolerancia (\pm)	0,09%		
Volumen Real V (mL)	0,30		
Incertidumbre expandida (mL)	0,002		

Pipetas de constricción de 0,4 mL \approx 400 μ L

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	31,5490	31,7291	0,1801
2	31,4588	31,7295	0,1310
3	31,4588	31,7296	0,1333
4	31,4588	31,7293	0,1350
5	31,4588	31,7294	0,1340
Promedio	31,4588	31,7294	0,1425
Desviación estándar	8,94E-05	0,0002	0,0003
Tolerancia (\pm)	0,09%		
Volumen Real V (mL)	0,41		
Incertidumbre expandida (mL)	0,001		

Pipetas de constricción de 0,5 mL \approx 500 μ L

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3787	43,7027	0,3240
2	43,3788	43,7128	0,3340
3	43,3787	43,7137	0,3350
4	43,3788	43,7128	0,3340
5	43,3787	43,7137	0,3350
Promedio	43,3787	43,7111	0,3324
Desviación estándar	5,47E-05	0,0047	0,005
Tolerancia (\pm)	0,09%		
Volumen Real V (mL)	0,51		
Incertidumbre expandida (mL)	0,01		

Pipetas de constricción de 1 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	31,5098	32,1786	0,1322
2	31,5098	32,1767	0,1310
3	31,5097	32,1776	0,1333
4	31,5094	32,1757	0,135
5	31,5095	32,1755	0,134
Promedio	31,5096	32,1768	0,6672
Desviación estándar	0,00018	0,0013	0,001
Tolerancia (±)	0,006 mL		
Volumen Real V (mL)	1,01		
Incertidumbre expandida (mL)	0,01		

Pipetas de constricción de 2,5 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3660	45,0294	1,6634
2	43,3660	45,0370	1,6710
3	43,3661	45,0377	1,6716
4	43,3660	45,0370	1,6710
5	43,3660	44,9930	1,6270
Promedio	43,3660	45,0268	1,6608
Desviación estándar	4,47E-05	0,0192	0,019
Tolerancia (±)	0,01 mL		
Volumen Real V (mL)	2,52		
Incertidumbre expandida (mL)	0,02		

Pipetas de constricción de 5 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3705	46,6983	3,3278
2	43,3702	46,6912	3,3210
3	43,3702	46,6854	3,3152
4	43,3703	46,6933	3,3230
5	43,3703	46,6893	3,319
Promedio	43,3703	46,6915	3,3212
Desviación estándar	0,00012	0,0048	0,005
Tolerancia (±)	0,01 mL		
Volumen Real V (mL)	5,05		
Incertidumbre expandida (mL)	0,02		

Matraz de aforo 1 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	7,2601	7,9210	0,6609
2	7,2602	7,9189	0,6590
3	7,2602	7,9224	0,6622
4	7,2601	7,9213	0,6610
5	7,2602	7,9202	0,6600
6	7,2602	7,9227	0,6630
7	7,2601	7,9191	0,6590
8	7,2602	7,9198	0,6600
9	7,2602	7,9225	0,6620
10	7,2601	7,9198	0,6600
Promedio	7,2602	7,9207	0,6606
Desviación estándar	5,16E-05	0,0013	0,001
Tolerancia (±)	0,01		
Volumen Real V (mL)	1,00		
Incertidumbre expandida (mL)	0,01		

Matraz volumétrico 5 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	11,1910	14,4892	3,2982
2	11,1910	14,4887	3,2977
3	11,1910	14,4891	3,2981
4	11,1910	14,4901	3,2991
5	11,1910	14,4907	3,2997
6	11,1910	14,4893	3,2983
7	11,1910	14,4902	3,2992
8	11,1910	14,4906	3,2996
9	11,1910	14,4908	3,2998
10	11,1910	14,4895	3,2985
Promedio	11,191	14,4898	3,2988
Desviación estándar	0	0,00075	0,001
Tolerancia (±)	0,02		
Volumen Real V (mL)	5,01		
Incertidumbre expandida (mL)	0,02		

Matraz volumétrico 10 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	20,2156	26,8275	6,6119
2	20,2155	26,8293	6,6138
3	20,2156	26,8287	6,6131
4	20,2156	26,8296	6,6140
5	20,2155	26,8265	6,6110
6	20,2156	26,8278	6,6122
7	20,2156	26,8288	6,6132
8	20,2155	26,8328	6,6173
9	20,2156	26,8302	6,6146
10	20,2156	26,8306	6,6150
Promedio	20,2156	26,8291	6,6136
Desviación estándar	4,83E-05	0,0017	0,002
Tolerancia (±)	0,02		
Volumen Real V (mL)	10,05		
Incertidumbre expandida (mL)	0,02		

Matraz volumétrico 25 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	29,218	45,7978	16,5798
2	29,2179	45,7853	16,5674
3	29,2179	45,7856	16,5677
4	29,218	45,7807	16,5627
5	29,2179	45,7841	16,5662
6	29,2179	45,7845	16,5666
7	29,218	45,7881	16,5701
8	29,2179	45,7816	16,5637
9	29,2179	45,7946	16,5767
10	29,218	45,7885	16,5705
Promedio	29,2179	45,7870	16,5691
Desviación estándar	5,16E-05	0,0054	0,005
Tolerancia (±)	0,03		
Volumen Real V (mL)	25,18		
Incertidumbre expandida (mL)	0,1		

Matraz volumétrico 50 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	43,3703	76,5366	33,1663
2	43,3704	76,5087	33,1383
3	43,3705	76,5235	33,1530
4	43,3703	76,5317	33,1614
5	43,3704	76,5107	33,1403
6	43,3705	76,5483	33,1778
7	43,3703	76,5443	33,1740
8	43,3704	76,5446	33,1742
9	43,3705	76,5445	33,1740
10	43,3703	76,5446	33,1743
Promedio	43,3704	76,5337	33,1634
Desviación estándar	8,75E-05	0,0147	0,015
Tolerancia (±)	0,05		
Volumen Real V (mL)	50,40		
Incertidumbre expandida (mL)	0,1		

Matraz volumétrico 100 mL

- Temperatura del hexano 22°C
- Densidad del hexano 0,659g/cm³
- Densidad del aire 0,0012g/cm³
- Temperatura de trabajo 22,6 °C

Temperatura de trabajo (°C)	Masa Inicial Mb (g)	Masa final Mc (g)	Mc-Mb (g)
1	60,4165	126,758	66,3415
2	60,4165	126,7562	66,3397
3	60,4164	126,7544	66,3380
4	60,4165	126,7557	66,3392
5	60,4165	126,7571	66,3406
6	60,4164	126,7652	66,3488
7	60,4165	126,1616	65,7451
8	60,4165	126,7517	66,3352
9	60,4164	126,7608	66,3444
10	60,4165	126,7553	66,3388
Promedio	60,4165	126,6976	66,2811
Desviación estándar	4,83E-05	0,1883	0,188
Tolerancia (±)	0,08		
Volumen Real V (mL)	100,74		
Incertidumbre expandida (mL)	0,2		

ANEXO 6

ECUACIONES UTILIZADAS PARA DETERMINAR EL LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL SISTEMA POR MEIER Y ZUND

Pendiente: $b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$ Intercepto: $a = \bar{Y} - b \cdot \bar{x}$

Coefficiente de correlación: $r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$

Coefficiente de determinación: $r^2 = (r)^2$

Suma de los cuadrados de la concentración: $S_{xx} = \sum(xi^2) - (\sum xi)^2/n$

Suma de los cuadrados de las concentraciones vs respuesta: $S_{xy} = \sum(xi * yi) - (\sum xi) * (\sum yi)/n$

Suma de los cuadrados de las respuestas: $S_{yy} = \sum(yi^2) - (\sum yi)^2 / n$

Desviación estándar de Y: $S_y = \sqrt{\frac{\left(S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}\right)}{n-2}}$

Desviación estándar al cuadrado de la suma de cuadrados de la concentración vs respuesta:

$$S_{xy^2} = (S_{xy})^2$$

Límite Detección del sistema: $LDs = (t * S_y) * \sqrt{\frac{\sum x^2 / (n * S_{xx})}{b}}$

Límite de Cuantificación del sistema: $LQs = (t * S_y) * \left(\sqrt{\frac{x^2}{n * S_{xx}}} + \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{LDs - \bar{x}}{S_{xx}}} \right)$

DONDE:

Sxx: Desviación estándar de la suma de los cuadrados de las concentración.

Sxy: Desviación estándar de la suma de los cuadrados de las concentraciones por la respuesta.

Syy: Desviación estándar de la suma de los cuadrados de las respuestas.

Sy: Desviación estándar de la respuesta.

Sx: Desviación estándar de la concentración.

X: concentración.

yi: Respuesta inicial.

(Meier, P., y Zund, R., 2000).

ANEXO 7

TABLA DE VALORES ESTADÍSTICA DE T-STUDENT

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

ANEXO 8

TABLAS DE RESULTADOS DE LA PRECISIÓN DE LA FRACCIÓN PAH's

Muestras fortificadas

N° Muestras	Concentración n adicionada (ppm)	Concentración recuperada (ng/mL) Sustituyendo Ec.4.			% de recobro (%r) Sustituyendo Ec.3.		
1	85,00	59,02	58,50	57,59	69,43	68,82	67,76
2	102,00	66,99	65,42	67,45	65,67	64,14	66,13
3	119,00	89,36	87,03	84,60	75,10	73,13	71,09

Suma de cuadrados y grados de libertad

N° muestras	Promedio del %r (P%r)	(%r-P%r) ²		$\Sigma(X_{ij} - \bar{X})^2$ $\Sigma(%r - P%r)^2$		ΣT_i ($\Sigma %r$)	ΣT_i^2 ($\Sigma %r^2$)
1	68,67	0,5	0,02	0,8	1,44	206,01	42440,61
2	65,32	0,1	1,38	0,6	2,17	195,95	38394,67
3	73,11	3,9	0,00	4,0	8,03	219,32	48101,08
n=3, h=3, N=9				Σ	11,6	621,28	128936,37
Fuente de variación		Suma de cuadrados		Grados de libertad		Cuadrado medio	
Entre muestras		(128936,37/3)- ((621,28) ² /9)=91,64		2		91,64/2=45,82	
Dentro de muestras		11,64		6		11,64/6=1,94	

- Estadístico de prueba de F:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$F = \frac{45,82}{1,94} = 23,62$$

- Coeficiente de variación:

$$Cv_{y/x} = \frac{3,91}{69,03} * 100\% = 5,66\%$$

ANEXO 9

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL SISTEMA PARA LA FRACCIÓN PAH's

Tratamiento estadístico para la determinación de LD y LC del sistema

Nivel Muestras	Abcisas Xi concentración (ng/mL)	Ordenadas Yi áreas	XY	X2	Y2
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	17,00	1387885,77	23594058,09	289,00	1,93E+12
3	34,00	2740818,72	93187836,38	1156,00	7,51E+12
4	68,00	4532544,78	308213045,24	4624,00	2,05E+13
5	102,00	6082528,39	620417895,78	10404,00	3,70E+13
6	136,00	8672896,80	1179513965,00	18496,00	7,52E+13
7	170,00	9876953,98	1679082177,00	28900,00	9,76E+13
Σ	527,00	33293628,44	3904008977,00	63869,00	2,40E+14
promedio	79,29	4756232,63	S _{xx} =24193,43	S _{yy} =8,14E+13	
S _{xy} ² = 1,95E+18	S _y = 368468,87	b= 57762,56	LD= 10,07	LC= 19,32	S _{xy} = 1397474379
- $t_5 = 2,57$; valor tomado de la tabla de student, a un grado de confianza del 95% y n-2 grados de libertad					

ANEXO 10

RESULTADO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO PARA LA FRACCIÓN PAH'S

Blancos matriz

N°	Áreas
1	241679,41
2	225161,26
3	225616,55
4	184820,78
5	203156,44
6	216580,48
S _{blanco}	19865,07
Y _{blanco}	215386,01
b	55726,52

Sustituyendo ecuación para el LD:

$$LD = \frac{215386,01 + (3 * 19865,07)}{55726,52} = 4,93$$

Sustituyendo ecuación para el LC:

$$LC = \frac{215386,01 + (10 * 19865,07)}{55726,52} = 7,43$$

ANEXO 11

ECUACIONES UTILIZADAS PARA DETERMINAR R, R², B, A, S_B, S_A, IC (A) Y IC(B) EN LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

Pendiente: $b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$ Intercepto: $a = \bar{Y} - b \cdot \bar{x}$

Coefficiente de correlación: $r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$

Coefficiente de determinación: $r^2 = (r)^2$

Suma de los cuadrados de la concentración: $S_{xx} = \sum(xi^2) - (\sum xi)^2/n$

Suma de los cuadrados de las concentraciones vs respuesta: $S_{xy} = \sum(xi * yi) - (\sum xi) * (\sum yi)/n$

Suma de los cuadrados de las respuestas: $S_{yy} = \sum(yi^2) - (\sum yi)^2 / n$

Desviaciones estándar de la pendiente: $S_b = \frac{S_y}{\sqrt{S_{xx}}}$

Desviaciones estándar del intercepto: $S_a = S_y * \sqrt{\sum X^2 / (n * S_{xx})}$

Desviación estándar de Y: $S_y = \sqrt{\frac{\left(S_{yy} - \left(\frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \right) \right)}{n-2}}$

Desviación estándar al cuadrado de la suma de cuadrados de la concentración vs respuesta:

$$S_{xy}^2 = (S_{xy})^2$$

Intervalo del 95% de confianza del intercepto: $\pm IC(a)_{95\%} = t^* S_a$ (n-2, grados de libertad)

Intervalo del 95% de confianza de la pendiente: $\pm IC(b)_{95\%} = t^* S_b$ (n-2, grados de libertad)

(Meier, P., y Zund, R., 2000).

ANEXO 12

ECUACIONES UTILIZADAS PARA DETERMINAR R Y R² PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Coeficiente de correlación: $r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} * S_{yy}}}$

Coeficiente de determinación: $r^2 = (r)^2$

Suma de los cuadrados de la concentración: $S_{xx} = \sum(xi^2) - (\sum xi)^2/n$

Suma de los cuadrados de las concentraciones vs respuesta: $S_{xy} = \sum(xi * yi) - (\sum xi) * (\sum yi)/n$

Suma de los cuadrados de las respuestas: $S_{yy} = \sum(yi^2) - (\sum yi)^2 /n$

Desviaciones estándar de la pendiente: $S_b = \frac{S_y}{\sqrt{S_{xx}}}$

Desviación estándar de Y: $S_y = \sqrt{\frac{\left(S_{yy} - \left(\frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}\right)\right)}{n-2}}$

Desviación estándar al cuadrado de la suma de cuadrados de la concentración vs respuesta:

$$S_{xy^2} = (S_{xy})^2$$

Intervalo del 95% de confianza de la pendiente: $\pm IC(b)_{95\%} = t * S_b$ (n-2, grados de libertad)

(Meier, P., y Zund, R., 2000)

ANEXO 13

LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA LA FRACCIÓN PAH's

Tratamiento estadístico para el cálculo de r , r^2 , b , a , S_b y S_a

Muestras	Abcisas Xi cantidad adicionada (ng/mL)		Ordenadas Yi cantidad recuperada (ng/mL)	XY	X ²	Y ²
1	80%	85,00	75,76	6439,27	7225,00	5738,99
2	100%	102,00	87,45	8920,28	10404,00	7648,15
3	120%	119,00	99,74	11868,95	14161,00	9947,88
Σ	306,00		262,95	27228,50	31790,00	23335,02
promedio	102,00		87,65	S _{xx} =578,00	S _{yy} =287,65	S _{xy} =407,71
S _b =0,01	S _a =1,03		r ² =0,9998	r=0,9999	± IC(a) _{95%} = 13,06	± IC(b) _{95%} = 0,13
S _{xy} ² =166227.44	S _y =0,24				a=15,70	b=0,71

Prueba estadística de t-student para r , b y a

Contraste estadístico de t-student		
r	b	a
$t = \frac{[0,9999]\sqrt{(1)}}{\sqrt{1 - 0,9998}} = 70,67$	$t_{calculado} = \frac{ 0,71 }{0,01} = 70,67$	$t_{calculado} = \frac{ 15,70 }{1,03} = 15,28$

ANEXO 14

LINEALIDAD DEL SISTEMA (INSTRUMENTO) PARA LA FRACCIÓN PAH'S

Intervalo para la linealidad del sistema

N°	Niveles Xi (ng/μL)	Abcisas Yi área	Promedi o (Yi)	XY	X ²	Y ²
1	17,00	1380735,74 1409273,76 1373647,81	1387885, 77	23594058,09	289,00	1,93E+12
2	34,00	2787815,17 2720661,24 2713979,74	2740818, 72	93187836,38	1156,00	7,51E+12
3	68,00	4583188,25 4392071,14 4622374,96	4532544, 78	308213045,2 4	4624,00	2,05E+13
4	102,00	6114875,47 6026706,39 6106003,31	6082528, 39	620417895,7 8	10404,00	3,70E+13
5	136,00	8717572,60 8781107,78 8520010,02	8749340, 19	1189910265, 84	18496,00	7,66E+13
6	170,00	9895655,52 9904947,68 9830258,73	9876953, 98	1679082176, 60	28900,00	9,76E+13
Σ	527,00		33370071,83	3914405278, 00	63869,00	2,41E+14
promed io	87,83		5561678,64	S _{xx} =17580,83	S _{yy} =5,55E +13	S _{xy} =98340 0635,53
r=0,996	r ² =0,991	S _{xy} ² = 9,67E+17		S _y = 347683,78	S _b = 2622,19	± IC(b) _{95%} = 7289,70

Prueba estadística de t-student:

$$t = \frac{[0,996]\sqrt{(4)}}{\sqrt{1 - 0,991}} = 21,33$$

ANEXO 15

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LA FRACCIÓN PAH'S

Cálculo para la preparación de la solución Intermedia:

$$C_2 = \frac{(c_1)(v_1)}{V_2} \rightarrow C_2 = \frac{\left(\frac{34086,00\text{mg}}{\text{L}}\right)(1\text{mL})}{50,00\text{ml}} = 681,72 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Cálculo para la preparación de la solución de trabajo:

$$V_1 = \frac{(5\text{mL})(340\text{ppm})}{681,72 \text{ ppm}} = 2,5\text{mL}$$

- Se tomaron 2,5mL de la solución intermedia PAH's a 680 ppm, para preparar la mezcla de trabajo a una concentración de 340 ppm.

Preparación de la solución del estándar:

$$C_1 = \frac{(0,30 \text{ mL})(340,00 \text{ ppm})}{1,00 \text{ mL}} = 102,00 \text{ ppm}$$

- Se tomaron 0,30 mL de la solución trabajo PAH's a 340,00 ppm, para preparar el estándar de trabajo a una concentración de 102,00 ppm.

ANEXO 16

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DEL MATERIAL DE REFERENCIA (SOLOCIÓN DE COMCUSTIBLE DIESEL)

Preparación de la solución Intermedia:

$$C_2 = \frac{(c_1)(v_1)}{v_2} \rightarrow C_2 = \frac{\left(\frac{50135,00 \text{ mg}}{L}\right)(1,00 \text{ mL})}{50,00 \text{ ml}} = 1002,70 \frac{\text{mg}}{L}$$

Preparación de la solución de trabajo:

$$V_1 = \frac{(10,00 \text{ mL})(100,27 \text{ ppm})}{1002,70 \text{ ppm}} = 1,00 \text{ mL}$$

- Se tomó 1,00 mL de la solución intermedia Combustible Diésel a 1002,70 ppm, para preparar la mezcla de trabajo a una concentración de 100,27 ng/μL.

Preparación de MR en el embudo:

$$C_2 = \frac{(1,00 \text{ mL})(100,27 \text{ ppm})}{1000,00 \text{ mL}} = 0,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- El resultado se multiplica por 1000 para pasar a unidades de parte por billón (*ppb*), lo cual tendremos un valor de: 100,00 *ppb*.
- Se tomó 1,00 mL de la solución trabajo PAH' a 100,27 ppm, para obtener una concentración de 100,00 *ppb* en el embudo.

ANEXO 17

INCERTIDUMBRE EN LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCION DE LA FRACCION PAH's

$$u_{Ci} = \sqrt{\left(\left(\frac{170,00}{1,96}\right) * 0,02\right)^2 + (0,003 * 681,72 + (0,05 * (-13,63)))^2}$$

$$u_{Ci} = 2,77$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre del estándar puro (u_{Cp}) = 170/1,96
- Incertidumbre en el volumen tomado del estándar puro (u_{Vp}) , para preparar la intermedia, que es equivalente a la incertidumbre de la pipeta utilizada en la medición de este volumen: pipeta 1,00 mL
- El volumen preparado de solución intermedia (v_i) = 50,00 mL.
- Incertidumbre en el volumen preparado (u_{vi}) , balón de 50,00 mL Concentración de la solución intermedia (C_i) 680,00 ppm.

Reportándose con una incertidumbre expandida (U):

$$U = (2,77)(2)$$

$$U = 5,54$$

Coefficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad del volumen tomado del estándar puro

$$\frac{\partial}{\partial V_p} = \frac{34086,00}{50,00} = 681,72$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar puro

$$\frac{\partial}{\partial C_p} = \frac{1,00}{50,00} = 0,02$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución intermedia

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = -\frac{34086 * 1}{50^2} = -13,63$$

Incertidumbre en la preparación de la solución trabajo

$$u_{trabajo} = \sqrt{(2,77 * 0,5)^2 + (0,01 * 136,34)^2 + (0,01 * (-68,17))^2}$$

$$u_{trabajo} = 2,06$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre en la solución Intermedia (u_{Ci}) = 2,77.
- Incertidumbre del volumen tomado (u_{v_i}): pipeta 2,5mL.
- El volumen preparado de solución trabajo (u_{v_t}): = 5mL.

Reportándose con una incertidumbre expandida (U):

$$U = (2,06)(2)$$

$$U = 4,12$$

Cálculos de los coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución intermedia

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = \frac{681,72}{5,00} = 136,34$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de la solución intermedia

$$\frac{\partial}{\partial C_i} = \frac{2,50}{5,00} = 0,50$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución trabajo

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = -\frac{2,50 * 681,72}{5,00^2} = -68,17$$

Incertidumbre de la concentración del estándar:

$$u_{C_{std}} = \sqrt{(2,06 * 0,30)^2 + (0,001 * 340)^2 + (0,004 * (-102))^2}$$

$$u_{C_{std}} = 0,81$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre en la solución de trabajo (u_{ct}) = 2,06.
- Incertidumbre del volumen tomado de la solución de trabajo (u_{v_t}): micropipeta 300,00 μ L.
- Incertidumbre del volumen preparado de la solución del estándar ($u_{v_{std}}$): = balón 1,00ML.

Reportándose con una incertidumbre expandida (U):

$$U = (0,81)(2)$$

$$U = 1,62$$

Coefficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de trabajo

$$\frac{\partial}{\partial C_t} = \frac{0,3}{1,00} = 0,30$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución de trabajo

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = \frac{340,00}{1,00} = 340,00$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución del estándar

$$\frac{\partial}{\partial V_{std}} = -\frac{340,00 * 0,3}{1,00^2} = -102,00$$

ANEXO 18

INCERTIDUMBRE EN LA PREPARACION DE LA SOLUCION DEL MATERIAL DE REFERENCIA (SOLUCION DE COMBUSTIBLE DIESEL)

Cálculo de la Incertidumbre en la preparación de la solución Intermedia

$$u_{ci} = \sqrt{\left(\left(\frac{251,00}{1,96}\right) * 0,02\right)^2 + (0,003 * 1002,70)^2 + (0,05 * (-20,05))^2}$$

$$u_{ci} = 4,08$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre del estándar puro (u_{cp}) = 251,00/1,96.
- Incertidumbre en el volumen tomado del estándar puro (u_{vp}) , para preparar la intermedia, que es equivalente a la incertidumbre de la pipeta utilizada en la medición de este volumen: pipeta 1,00 mL
- El volumen preparado de solución intermedia (v_i) = 50,00 mL.
- Incertidumbre en el volumen preparado (u_{vi}) , balón de 50,00 mL.
- Concentración de la solución intermedia (C_i) 1002,70 ppm.

Reportándose con una incertidumbre expandida (U):

$$U = (4,08)(2)$$

$$U = 8,16$$

Coeficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad del volumen tomado del estándar puro

$$\frac{\partial}{\partial V_p} = \frac{50135,00}{50,00} = 1002,70$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración del estándar puro

$$\frac{\partial}{\partial C_p} = \frac{1,00}{50,00} = 0,02$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución intermedia

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = -\frac{1,00 * 50135,00}{50,00^2} = -20,05$$

Cálculo de la incertidumbre en la preparación de la solución trabajo

$$u_{trabajo} = \sqrt{(4,08 * 0,1)^2 + (0,003 * 100,27)^2 + (0,01 * (-10,03))^2}$$

$$u_{trabajo} = 0,52$$

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre en la solución Intermedia (u_{C_i}) = 4,08
- Incertidumbre del volumen tomado (u_{v_i}) = pipeta 1,00 mL
- El volumen preparado de solución trabajo (u_{v_t}) = 10,00 mL

Coefficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución intermedia

$$\frac{\partial}{\partial V_i} = \frac{1002,70}{10,00} = 100,27$$

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de la solución intermedia

$$\frac{\partial}{\partial C_i} = \frac{1,00}{10,00} = 0,10$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la solución trabajo

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = -\frac{1,00 * 1002,70}{10,00^2} = -10,03$$

Incertidumbre de la concentración en el embudo:

$$u_{C_{embudo}} = \sqrt{(0,52 * 0,001)^2 + (0,003 * 0,10)^2 + (2,45 * (-0,0001))^2}$$

$$u_{C_{embudo}} = 0,001 \text{ ppm}$$

Este valor se reporta en ppb, para eso se multiplica por 1000 dando: 0,65 ppb

Valores que debemos tener en cuenta:

- Incertidumbre en la solución de trabajo (u_{C_t}) = 0,52.
- Incertidumbre del volumen tomado de la solución de trabajo (u_{V_t}): pipeta 1,00 mL
- Incertidumbre del volumen de la muestra ($u_{V_{muestra}}$): = probeta 1000,00 mL.

Reportándose con una incertidumbre expandida (U):

$$U = (0,65)(2)$$

$$U = 1,30$$

Coefficientes de sensibilidad:

- Coeficiente de sensibilidad para la concentración de trabajo

$$\frac{\partial}{\partial C_t} = \frac{1,00}{1000,00} = 0,001$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen tomado de la solución de trabajo

$$\frac{\partial}{\partial V_t} = \frac{100,27}{1000,00} = 0,10$$

- Coeficiente de sensibilidad para el volumen de la muestra

$$\frac{\partial}{\partial V_{std}} = -\frac{100,27 * 1,00}{1000,00^2} = -0,0001$$

ANEXO 19

TABLA DE PROBABILIDADES ACUMULATIVAS

Algunos valores de Z					
P (%)	50	68	90	95	99
Z	0.68	1.00	1.64	1.96	2.58

(Chacon, J., 2004)

TABLA DE FISHER

Tabla A.3. Valores críticos de F para un contraste de una cola ($P = 0.05$).

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.

(Miller, J., y Miller, J., 2002)

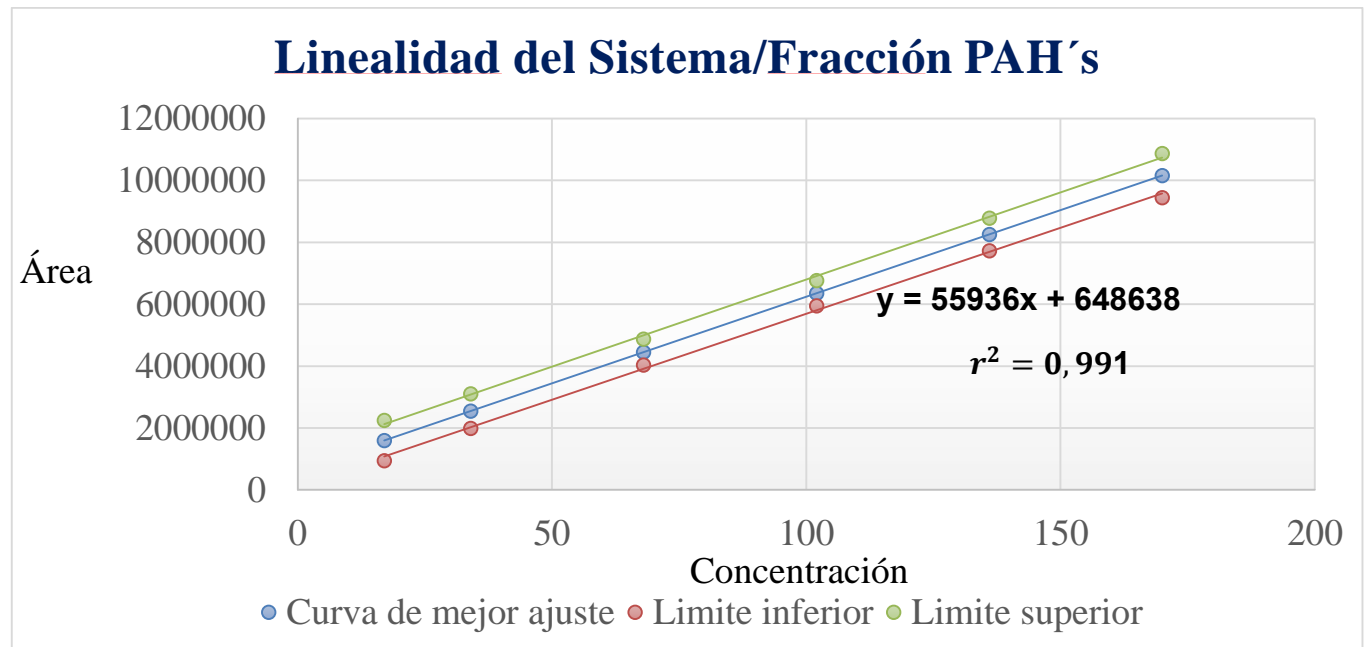
ANEXO 21

TOLERANCIAS ESTABLECIDAS POR LA ASTM PARA EQUIPOS VOLUMÉTRICOS DE VIDRIO CLASE A

Tolerancias establecidas por la ASTM para varios equipos volumétricos de vidrio clase A						
Capacidad (ml)	Pipeta		Bureta	Balón		Probeta
	Bulbo	Graduada		Contener	Verter	
1	0,006	0,01	.	0,010	.	.
2	0,006	0,01	.	0,015	.	.
3	0,01	.	.	0,015	.	.
4	0,01
5	0,01	0,02	0,01	0,020	.	0,1
10	0,02	0,03	0,02	0,020	0,40	0,2
15	0,03
20	0,03
25	0,03	0,05	0,03	0,03	0,05	0,3
50	0,05	.	0,05	0,05	0,1	0,5
100	0,08	.	0,10	0,08	0,15	1,0
200	.	.	.	0,10	0,2	.
250	.	.	.	0,12	.	2,0
300	0,25	.
500	.	.	.	0,20	0,3	4,0
1000	.	.	.	0,30	0,5	6,0
2000	.	.	.	0,50	1	12,0
3000	.	.	.	1,0	1,5	.
4000	.	.	.	1,0	2	29,0
5000	.	.	.	1,5	2,4	.
6000	.	.	.	2,0	.	.

(Chacon, J., 2004)

GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA (INSTRUMENTO) FRACCIÓN PAH'S

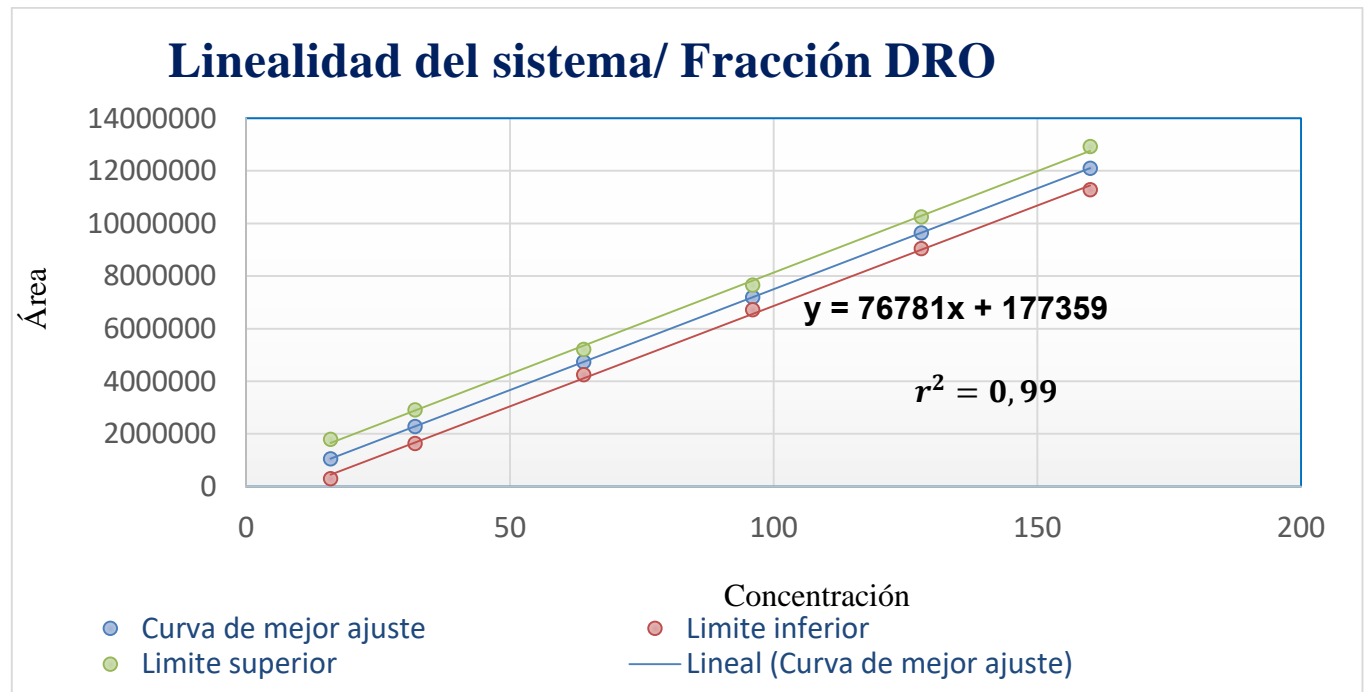


Los límites de confianza (LC) de la curva se calcularon utilizando la *Ec.18*, mostrados en la siguiente tabla:

Límites de confianza para la curva de calibración Fracción PAH's

Concentración ppm (X _i)	Área corregida (Y ₀)	Límite de Confianza (LC)	Intervalo inferior Y ₀ (i) - LC95%	Intervalo superior Y ₀ (i) + LC95%
17,00	1599548,76	649867,42	949681,34	2249416,18
34,00	2550459,93	556513,21	1993946,72	3106973,14
68,00	4452282,27	420249,63	4032032,65	4872531,90
102,00	6354104,61	407886,63	5946217,99	6761991,24
136,00	8255926,95	528197,13	7727729,82	8784124,09
170,00	10157749,30	717266,95	9440482,35	10875016,24

GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA (INSTRUMENTO) FRACCIÓN DRO

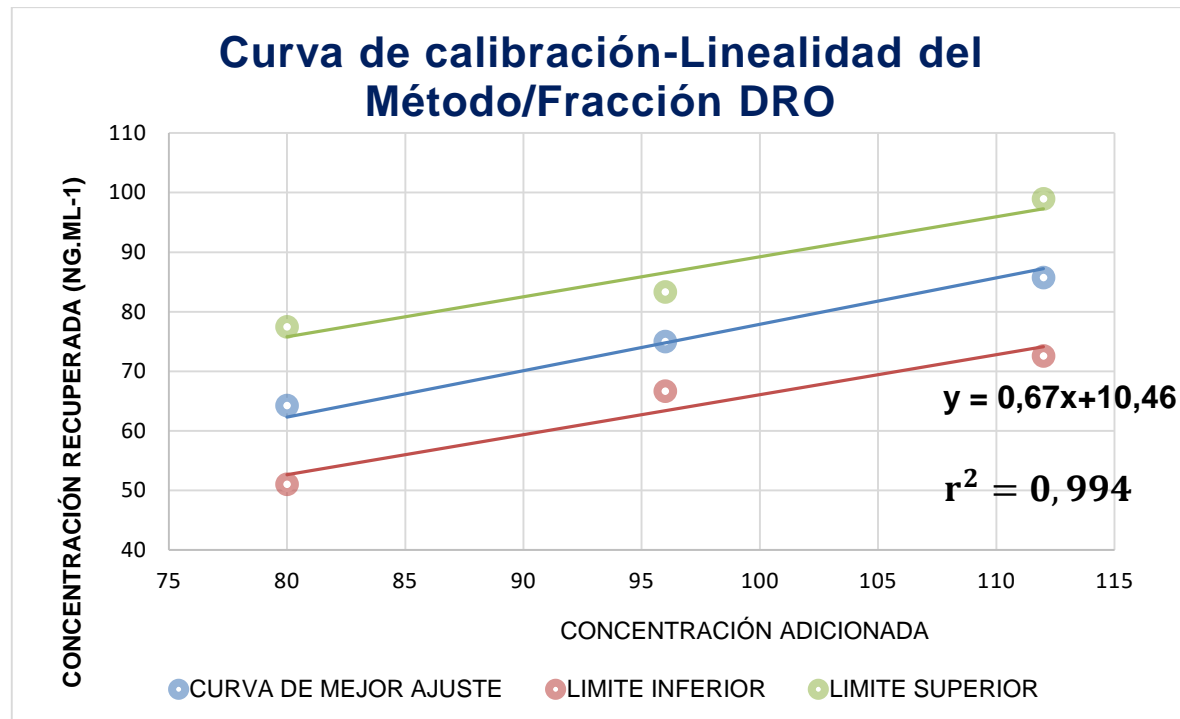


Los límites de confianza (LC) de la curva se calcularon utilizando la *Ec.18*, mostrados en la siguiente tabla:

Límites de confianza para la curva de calibración/ Fracción DRO

Concentración ppm (X_i)	Área corregida (Y_0)	Límite de Confianza (LC)	Intervalo inferior $Y_0 (i) - LC95\%$	Intervalo superior $Y_0 (i) + LC95\%$
16	1051137,06	745377,12	305759,94	1796514,18
32	2279633,52	638302,83	1641330,69	2917936,35
64	4736626,44	482012,87	4254613,58	5218639,31
96	7193619,37	467832,90	6725786,46	7661452,27
128	9650612,29	605825,20	9044787,09	10256437,49
160	12107605,21	822682,22	11284922,99	12930287,43

GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO FRACCIÓN DRO

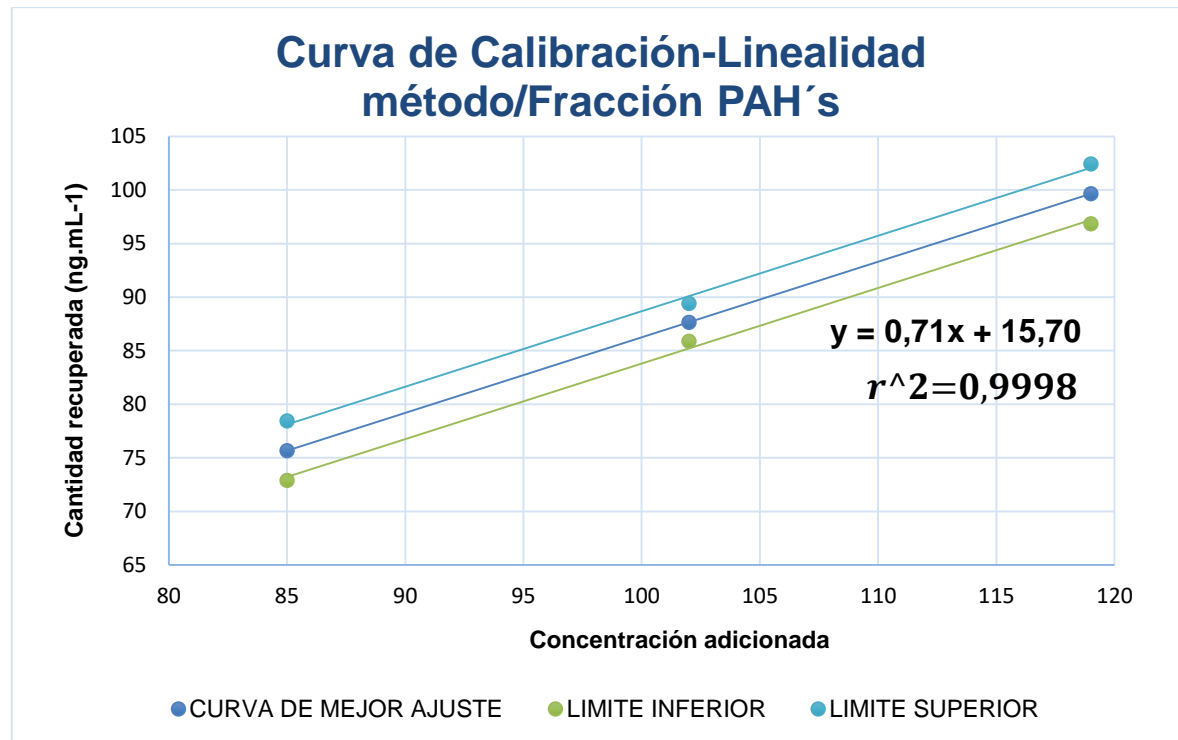


Los límites de confianza (LC) de la curva se calcularon utilizando la *Ec. 18*.

Límites de confianza para la curva de calibración/ Fracción DRO

Concentración adicionada ppm (Xi)	Concentración recuperada corregida ng/mL (Y ₀)	Límite de Confianza (LC)	Intervalo inferior Y ₀ (i) - LC95%	Intervalo superior Y ₀ (i) + LC95%
80,00	64,22	13,19	51,03	77,41
96,00	74,97	8,34	66,63	83,31
112,00	85,72	13,19	72,54	98,91

GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO FRACCIÓN PAH'S



Los límites de confianza (LC) de la curva se calcularon utilizando la Ecu. 18, mostrados en la siguiente tabla:

Límites de confianza para la curva de calibración/ Fracción PAH's

Concentración adicionada ppm (X_i)	Concentración recuperada corregida ng/mL (Y_0)	Límite de Confianza (LC)	Intervalo inferior $Y_0 (i) - LC95\%$	Intervalo superior $Y_0 (i) + LC95\%$
85	75,66	2,78	72,87	78,44
102	87,65	1,76	85,89	89,41
119	99,64	2,78	96,86	102,43

ANEXO 26

CERTIFICADO DE PUREZA DEL MATERIAL DE REFERENCIA SOLUCION DE COMBUSTIBLE DIESEL



Certificate of Analysis

Composite #2 Diesel Fuel Solution

Product Number: RGO-616 Page: 1 of 1
Lot Number: CD-2271 Lot Issue Date: Aug-2007 Expiration Date: Aug-2011

This Certified Reference Material (RM) was manufactured and verified in accordance with ULTRA's ISO 9001 registered quality system, and the analyte concentrations were verified by our ISO 17025 accredited laboratory. The true value and uncertainty value at the 95% confidence level for each analyte, determined gravimetrically, is listed below.

Analyte	CAS#	Analyte Lot	True Value
diesel fuel #2 (composite)	068334-30-5	N980035	50135 ± 251 µg/mL

Matrix: methylene chloride (dichloromethane)

ULTRA uses balances calibrated with weights traceable to NIST in compliance with ANSI/NCSL Z-540-1 and ISO 9001, and calibrated Class A glassware in the manufacturing of these standards.



ISO 17025
Accredited
KLA
Cert. No. 0887-01

ISO 9001:2008
Registered
TUV USA, Inc.
Cert. No. 06-1064

250 Smith Street, North Kingstown, RI 02882 USA
401-294-9400 Fax: 295-2330
www.ultrasci.com

William J. Leahy
Quality Assurance Manager

CERTIFICADO DE PUREZA DEL ESTANDAR DRO MIXTURE

ULTRA SCIENTIFIC
Analytical Solutions

Certificate of Analysis

DRO Mixture (Tennessee/Mississippi)

Product Number: UST-210 Page: 1 of 1
 Lot Number: CM-2155 Lot Issue Date: 08-May-2015 Expiration Date: 31-May-2018

This certified Reference Material (RM) was manufactured and verified in accordance with ULTRA's ISO 9001 registered quality system, and the analyte concentrations were verified by our ISO 17025 accredited laboratory. The true value and uncertainty value at the 95% confidence level for each analyte, determined gravimetrically, is listed below.

Analyte	CAS#	Analyte Lot	True Value
n-decane	000124-18-5	RM00137	1001 ± 5 µg/mL
n-undecane	001128-21-4	RM04270	1002 ± 5 µg/mL
n-dodecane	000112-40-3	RM07723	1004 ± 5 µg/mL
n-tridecane	000829-50-5	RM04185	1003 ± 5 µg/mL
n-tetradecane	000829-59-4	NT01828	1002 ± 5 µg/mL
n-pentadecane	000829-62-9	RM01063	1002 ± 5 µg/mL
n-hexadecane	000544-76-3	NT01442	1002 ± 5 µg/mL
n-heptadecane	000829-78-7	RM04189	1004 ± 5 µg/mL
n-octadecane	000523-45-3	RM03869	1003 ± 5 µg/mL
n-nonadecane	000629-82-5	NT01739	1000 ± 5 µg/mL
n-eicosane	000112-85-8	RM04169	1005 ± 5 µg/mL
n-heneicosane	000629-94-7	RM04170	1004 ± 5 µg/mL
n-docosane	000829-97-0	RM08129	1003 ± 5 µg/mL
n-tricosane	000535-67-5	RM09075	1003 ± 5 µg/mL
n-tetracosane	000546-31-1	NT01714	1003 ± 5 µg/mL
n-pentacosane	000829-99-2	NT00444	1003 ± 5 µg/mL

Matrix: methylene chloride (dichloromethane)
 Storage: Store at Room Temperature (15-30°C)

ULTRA uses balances calibrated with weights traceable to NIST in compliance with ANSI/NCSL Z-540-1 and ISO 9001, and calibrated Class A glassware in the manufacturing of these standards.

ANAB ISO 9001 Registered 907 USA, Inc.

William D. Long
Quality Assurance Manager

355 SMITH STREET N. KINGSTOWN, RHODE ISLAND 02882 USA WWW.ULTRA&CI.COM

CERTIFICADO DE PUREZA DEL ESTANDAR PAH'S MIXTURE



Certificate of Analysis



PAH Mixture

Product Number: US-126 Page: 1 of 1
 Lot Number: CM-2918 Lot Issue Date: 02-Jun-2015 Expiration Date: 30-Jun-2018

This certified Reference Material (RM) was manufactured and verified in accordance with ULTRA's ISO 9001 registered quality system, and the analyte concentrations were verified by our ISO 17025 accredited laboratory. The true value and uncertainty value at the 95% confidence level for each analyte, determined gravimetrically, is listed below.

Analyte	CAS#	Analyte Lot	True Value
acenaphthene	000083-32-9	RM00070	2002 ± 10 µg/mL
acenaphthylene	000208-06-6	RM08993	2006 ± 10 µg/mL
anthracene	000120-12-7	RM03477	2007 ± 10 µg/mL
benz[a]anthracene	000056-55-3	RM06786	2006 ± 10 µg/mL
benz[b]fluoranthene	000205-09-2	RM09998	2006 ± 10 µg/mL
benzo[k]fluoranthene	000207-08-0	RM06787	2004 ± 10 µg/mL
benzo[ghi]perylene *	000181-24-2	RM09993	2008 ± 10 µg/mL
benzo[a]pyrene †	000050-32-8	RM06930	2006 ± 10 µg/mL
carbazole	000060-74-8	NT01103	2003 ± 10 µg/mL
chrysene	000218-01-9	RM07336	2006 ± 10 µg/mL
benz[a,h]anthracene *	000053-70-3	RM06786	2001 ± 10 µg/mL
fluoranthene	000206-44-0	NTC0940	2003 ± 10 µg/mL
fluorene	000056-73-7	RM09441	2009 ± 10 µg/mL
indeno[1,2,3-cd]pyrene	000193-36-6	RM06789	2004 ± 10 µg/mL
naphthalene	000091-20-3	RM02406	2005 ± 10 µg/mL
phenanthrene	000085-01-8	NT00954	2007 ± 10 µg/mL
pyrene	000129-00-0	RM03479	2002 ± 10 µg/mL

Matrix: methylene chloride/benzene (1:1)
Storage: Store at Room Temperature (15-30°C)

ULTRA uses balances calibrated with weights traceable to NIST in compliance with ANSI/NCSL Z-540-1 and ISO 9001, and calibrated Class A glassware in the manufacturing of these standards.



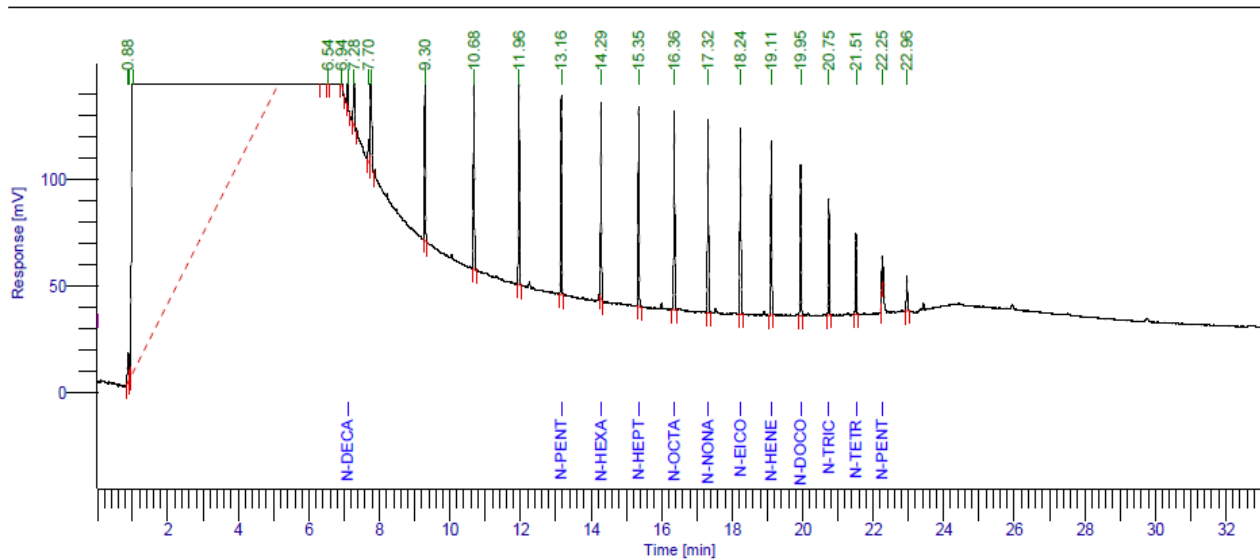
ISO 9001
Registered
TUV USA, Inc.


 William J. Lantz
 Quality Assurance Manager

250 SMITH STREET • KINGSTOWN, RHODE ISLAND 02882 USA WWW.ULTRASCI.COM

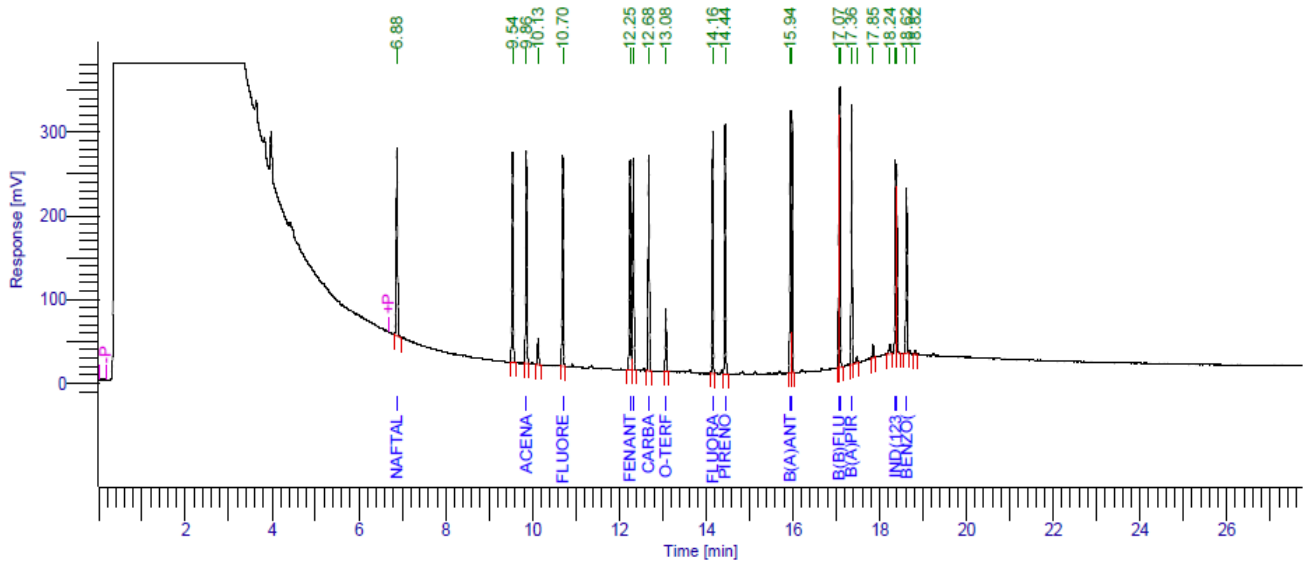
ANEXO 29

CROMATÓGRAMA DE LA SOLUCION RANGO ORGANICO DE DIESEL (DRO)



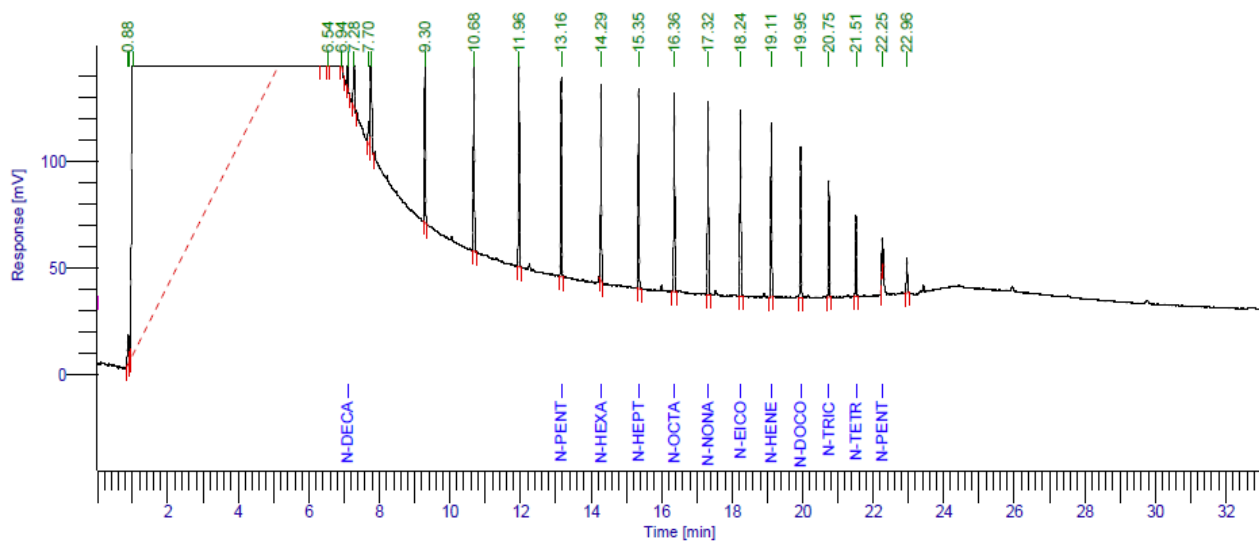
ANEXO 30

CROMATÓGRAMA DE LA SOLUCION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS



ANEXO 31

CROMATOGRAMA DE LA SOLUCION COMBUSTIBLE DIESEL



ANEXO 32

ALCANCE DE LA VALIDACIÓN SEGÚN EL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO POR LA POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE LABORATORIOS DE ENSAYOS Y CALIBRACIÓN



	OFICINA NACIONAL DE ACREDITACIÓN			
	Política Para la Validación de Métodos de Laboratorios de Ensayos y Calibración.			
	DOC-ONA-12-011	Versión Nº:01	Revisión Nº:00	

Tabla b: Alcance de la validación según el tipo de procedimiento de ensayo

Parámetros	Métodos Normalizados			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del Método	No	+	+	+
Rango	No	+	+	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	No	No
Límite de Cuantificación	No	+	+	+
Robustez	+	+	+	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ej: disolución, liberación de analitos, etc) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.

Parámetros	Métodos Normalizados Modificados o No Normalizados			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del Método	No	Sí	Sí	+

Página 13 de 49

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico de la ONA	Ing. Eduardo Zamora Consultor de la ONA	Lic. Adela Miranda Espinoza Responsable de ONA
Fecha: 2012-01-09	Fecha: 2012-05-29	Fecha: 2012-11-26

Las copias impresas de este documento son SOLO REFERENCIA. Remitirse a ONA para obtener la versión más reciente

(ONA, 2012)



	OFICINA NACIONAL DE ACREDITACIÓN			
	Política Para la Validación de Métodos de Laboratorios de Ensayos y Calibración.			
	DOC-ONA-12-011	Versión Nº:01	Revisión Nº:00	

Rango	No	Sí	Sí	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	+	No	Sí	No
Límite de Cuantificación	No	+	Sí	+
Robustez	+	+	+	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis o de las modificaciones que se le hagan al método.

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (ej: disolución, liberación de analitos, etc) el método usado para la cuantificación (cuando aplique) se validará de acuerdo a columnas 2 ó 3.

Parámetros	Métodos Desarrollados / Internos			
	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/ Especificidad	Sí	Sí	Sí	+
Estabilidad analítica de la muestra	Sí	Sí	Sí	+
Linealidad del Sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del Método	No	Sí	Sí	+
Rango	No	Sí	Sí	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión Intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de Detección	Sí	No	+	No
Límite de Cuantificación	No	+	Sí	+
Robustez	+	Sí	Sí	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico de la ONA	Ing. Eduardo Zamora Consultor de la ONA	Lic. Adela Miranda Espinoza Responsable de ONA
Fecha: 2012-01-09	Fecha: 2012-05-29	Fecha: 2012-11-26

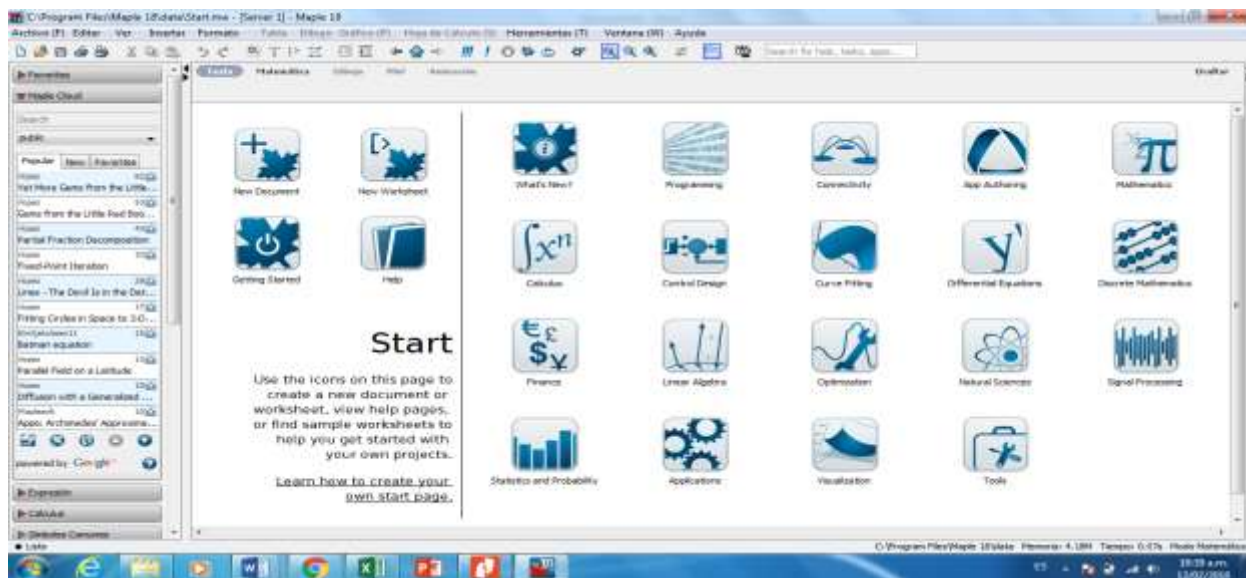
(ONA, 2012)

ANEXO 33

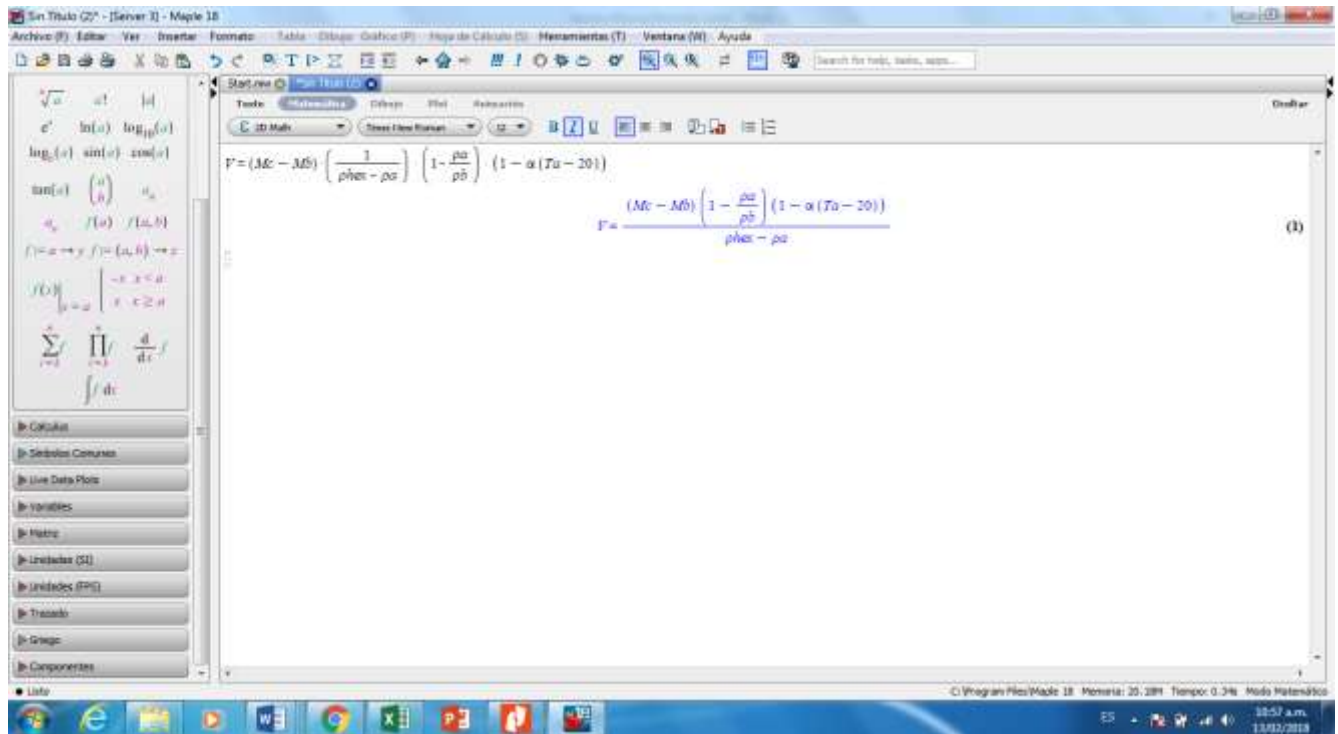
CALCULOS DE LOS COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD UTILIZANDO EL PROGRAMA MAPLE 18



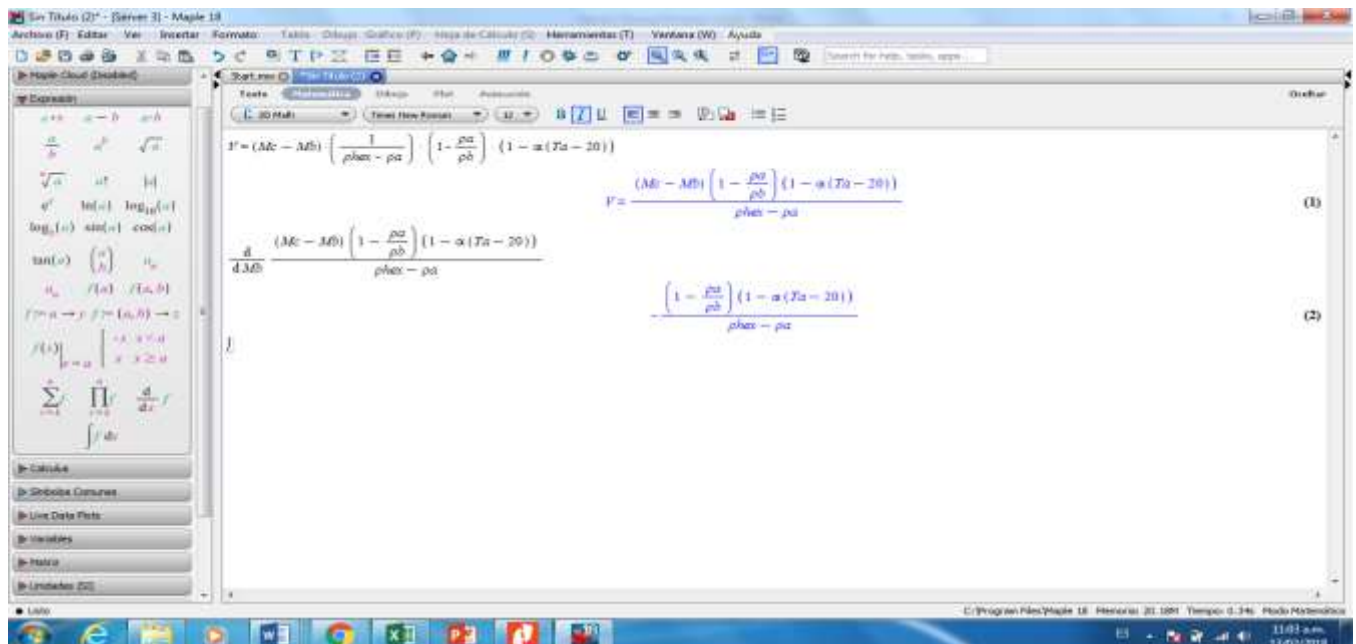
Programa matemático Maple 18, versión 2014.



Inicio del programa (opciones de las funciones; selección de nuevo documento)



Se introduce la ecuación y luego el programa identifica.



Se selecciona la función de derivada parcial para la variable a derivar de la ecuación insertada, dando inmediatamente el resultado.

GLOSARIO

Aseguramiento de la calidad: Todas las actividades planificadas y sistemáticas implementadas dentro del sistema de calidad, y evidencias como necesarias para dar adecuada confianza de que una entidad cumplirá los requisitos de calidad.

Calibración: Establecer las funciones matemáticas para que las magnitudes que lee el instrumento se expresen en las unidades de la magnitud objetivo y cumplir con la incertidumbre apropiada para cumplir con la del método.

Cromatografía: Método de análisis químico para la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil.

Cromatogramas: Representación gráfica de los picos de elución de una mezcla en un plano de coordenadas en cuya abscisa se encuentra el tiempo o volumen de retención y en ordenadas la señal del detector en milivolts (mV). Es el registro obtenido al representar gráficamente la salida de los distintos componentes de la mezcla.

Curva de Calibración: Representación gráfica de la señal de medición como una función de la cantidad de analito.

Control de calidad: Técnicas de operación y actividades usadas para cumplir con los requerimientos de calidad.

Criterio de aceptación: Valor o intervalo de una especificación o propiedad que define como apta.

DRO: Rango Orgánico de Diésel (C₁₀-C₂₅).

Embudos: Se usan para separar sólidos de líquidos, utilizando un medio filtrante. Las hay de tallo largo para filtración rápida y de tallo corto para filtración lenta, se encuentran en diferentes diámetros.

Ensayo: Operación técnica que consiste en la determinación de una o más características de un determinado producto, material, equipo, organismo, fenómeno, proceso o servicio de acuerdo con un procedimiento o método especificado.

Desviación Estándar: Es una medida del grado de dispersión de los valores alrededor de una media en una distribución de valores.

Incertidumbre (de medición): Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Incertidumbre estándar: $u(x_i)$ la incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar.

Incertidumbre estándar combinada: la incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando el resultado se obtiene a partir de los valores de un cierto número de otras magnitudes y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, siendo éstos, las varianzas o covarianzas de esas otras magnitudes ponderadas de acuerdo a como varía el resultados de la medición con respecto a esas magnitudes.

Incertidumbre expandida: (U) magnitud que define un intervalo alrededor del resultado de una medición el que se espera cubra una fracción grande de la distribución de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando.

Intervalo: El intervalo de trabajo de un método está determinado por el examen de muestra con diferentes concentraciones del analito y determinando el intervalo de concentraciones para las cuales se obtiene una incertidumbre aceptable.

Linealidad: Para métodos cuantitativos está determinada por la medida de una muestra de concentraciones del analito que incluyen en el intervalo precisado por el método.

Media: Es la suma de todos los valores dividido por el número de casos n .

Método: Procedimiento normalizado de trabajo concerniente al ensayo que aplica incertidumbre de la medida: Optimización: Operación destinada ajustar los parámetros de operación para que logre las especificaciones requeridas o máximas.

Muestra: Es una pequeña parte de la población elegida adecuadamente para que sea representativa del total de la población.

Nivel de confianza: La probabilidad de que el valor de la magnitud a medir permanezca dentro de la amplitud del rango de incertidumbre.

PAH's: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Pipetas: Se utilizan para medir volúmenes con gran exactitud. Las hay volumétricas y graduadas.

Población: Es el conjunto total de individuos o sucesos que queremos estudiar.

Probetas: Están graduadas y se utilizan para medir volúmenes de líquidos. Las hay de diferentes capacidades.

Precisión: Es la conformidad entre los resultados de análisis químicos ambientales independientes y que generalmente se expresan en término de desviación estándar; esta depende de la concentración del analito y de las condiciones en las cuales se hace el cálculo.

Procedimientos: Manera específica de realizar una actividad.

Producto: El resultado de actividades y procesos.

Repetibilidad: Es un tipo de precisión que relaciona las medidas hecha bajo condiciones de repetibilidad: el mismo método; el mismo material; el mismo operador; el mismo operador; el mismo laboratorio; dentro de un periodo muy estrecho en que se efectúa el análisis.

Validación: Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Validación de un Método:

1. El proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto. ¿Qué analitos puede determinar el método, en qué matrices, en presencia de qué interferencias? ¿En esas condiciones, qué niveles de precisión y de exactitud pueden alcanzarse?

2. El proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular.

Verificación: Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.