

ESTANDARIZACIÓN, VALIDACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN AGUAS DEL RÍO CUYABENO.

Velásquez, Verónica

*Laboratorio Centrocésal, Universidad de las fuerzas-ESPE,
departamento de ciencias de la vida, carrera de ingeniería en biotecnología*

Resumen:

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos muy débilmente polares, se caracteriza por ser liposolubles y se consideran como indicadores de la contaminación. El propósito de esta investigación fue desarrollar un procedimiento estandarizado y validado para la determinación y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas de consumo humano, también se realizó la evaluación de la calidad del agua del río Cuyabeno de acuerdo a los parámetros físico-químicos analizados se determinó que las aguas del río Cuyabeno son aceptables para el desarrollo de la fauna y flora; aunque presenta poca contaminación en la determinación del Índice de Calidad del Agua. Se Validó el método EPA 550.1 determinando y demostrando el cumplimiento de los siguientes parámetros: precisión, estimación de la incertidumbre, límites de detección y cuantificación, intervalo de trabajo, linealidad y exactitud del método.

Palabras claves: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, Índice de calidad de Agua, linealidad, precisión y exactitud

Abstract:

The polycyclic aromatic hydrocarbons are very weakly polar compounds, they are characterized by being soluble and are considered as indicators of pollution. The purpose of this research was to develop a standardized and validated procedure for the identification and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in water for human consumption, evaluating also Cuayabeno's water quality. According to the physicochemical parameters that were analyzed, it was determined that the waters of Cuyabeno River are acceptable for the development of wildlife, although it has little pollution in determining the Water Quality Index. The EPA 550.1 method was validated determining and demonstrating compliance of the following parameters: precision, uncertainty estimation, detection and quantification limits, working range, linearity and accuracy of the method

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons, water quality index, linearity precision and accuracy.

Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP'S) se forman durante el proceso de pirolisis o combustión incompleta de materia orgánica y en procesos petrogénico, los podemos encontrar en las emisiones vehiculares, procesos industriales, en el aire, agua, suelos y alimentos contaminados; también se originan de forma natural en las erupciones de volcanes. Se consideran como compuestos peligrosos, por su gran toxicidad y se caracterizan por ser lipofílicos; si la masa molecular de estos compuestos aumenta, mayor es su tendencia a ser sustancias lipofílicas, por esta razón tienen la facilidad de unirse a tejidos adiposos generando efectos fisiopatológicos en los humanos y en los animales (Agudo, 2009).

En 1775 se manifestó los primeros hallazgos de afecciones ocasionados por hidrocarburos aromáticos policíclicos en el campo laboral, médicos británicos Sir Percival Pott y John Hill, observaron e informaron del cáncer de piel del escroto en trabajadores que estaban expuestos por largo plazo al hollín (Rodríguez, 2009).

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) afirmó, que algunos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos son carcinógenos, y tienen la capacidad de aumentar el efecto carcinogénico de otros HAP'S (Garavito, 2006).

La legislación internacional como la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido estándares de calidad y muestra un gran interés por la contaminación de compuestos orgánicos (HAP'S), de igual manera las Normas ISO (Organización Internacional de Estandarización) 14001 regulan la contaminación ambiental.

Los altos niveles de HAP'S en el entorno terrestre como acuático se atribuyen a la actividad petrolera (Ching, Aiken, & Danielsen, 1997), ya que desde sus inicios, el medio en que se ha desarrollado esta actividad se ha visto afectado por derrames de petróleo, por la mala extracción petrolera, por accidentes en los tanques de almacenamiento o en los oleoductos y en las prácticas de exploración como explotación del petróleo, generando un impacto negativo tanto al ambiente como a los seres vivos que tiene contacto con el hábitat contaminada (Torres & Zuluaga, 2009).

El derramamiento del petróleo y la mala práctica que se ha llevado a cabo en todo el ciclo de vida del petróleo, desde la exploración hasta la obtención de crudo, ha producido gran contaminación medioambiental, las consecuencias que se han generado han sido devastadoras, como ocurrió en el derrame de petróleo del Exxon Valdez, en Alaska, más de 900 nutrias marinas fueron afectadas, presentando los siguientes síntomas: hipotermia (debido a la

reducción drástica de las propiedades aislantes de su piel), letargo, diarrea y hemorrágica, también se determinó que la mayor parte de nutrias presentaban enfisema, que es un tipo de enfermedad pulmonar. Independientemente del grado de contaminación las nutrias perecieron (Lipscomb, Harris, Reba, Ballachey, & Haebler, 1996).

En nuestro país; la zona nororiental amazónica ha recibido por varios años el impacto de la explotación petrolera, inclusive antes de 1993 las políticas encargadas de la protección ambiental y de la reducción de los efectos desbastadores y contaminantes de las industrias petroleras, no estaban claramente determinadas (FLACSO, 2003).

En 1964 la empresa petrolera encargada de la exploración y explotación del petróleo en nuestro país fue CHEVRON-Texaco, presentando muchos inconvenientes, como tecnologías obsoletas y una alta contaminación ambiental. Las principales irregularidades que presentaba fue la construcción de piscinas sin recubrimientos, el descargue a fuentes naturales de las aguas de formación sin ser tratadas, la quema incompleta del gas y el ocultamiento de los derrames (Fajardo & Heredia, 2010).

Como producto de la contaminación petrolera, la calidad del agua, suelos, alimentos, plantas, animales y personas de esta región fueron

afectados severamente; los principales problemas de salud que se encontraron fueron: hongos en la piel, irritación nasal, dolor de garganta y de cabeza, irritación de ojos, dolor de oídos, diarrea y gastritis (San, et al; 2001; Muñoz, Barriga, Cabrera, Vera & López, 2010).

La legislación ambiental ecuatoriana como el reglamento sustitutivo del reglamento ambiental para las operaciones hidrocarburíferas en el Ecuador, decreto 1215 Registro Oficial 265 de 13 de febrero del 2001 y el Texto Unificado de Legislación Ambiental del Ministerio del Ambiente (TULSMA), Libro VI, visualiza el monitoreo, evaluación y regulación de los HAP'S.

En este sentido con ayuda del laboratorio CENTROCESAL Cía. Ltda. esta investigación pretende implementar un método analítico, para evaluar la concentración de HAP'S en aguas y que este proporcione confiabilidad en los resultados y a la vez el cumplimiento de la norma 17025.

La importancia de la validación analítica es determinar si el método que se está empleando funciona correctamente, es decir si el método en consideración es apto para lo que demanda la aplicación. Esta investigación nos proporciona confiabilidad en los resultados ya que el método que va hacer validado debe ser reproducible, y sobre todo sensibles, es decir, que permitan alcanzar los niveles de detección y cuantificación lo más

bajo posible, tratando de que éstos sean inferiores a los que marque la normatividad.

Parte experimental

Trabajo en campo

Se realizó el recorrido por el área de estudio con el propósito de establecer las descargas que recibe el río Cuyabeno, a su vez se determinó los puntos de toma de muestra, utilizando un GPS (Sistema de Posicionamiento Global), para ser establecidos en un mapa

Se tomaron muestras puntuales, a lo largo y en la zona central del río, procurando no remover el fondo y evitando los estancamientos, se utilizó frascos de vidrio ámbar de 1 L, previamente lavados con agua del río, colocando la boca del frasco contra la corriente para evitar su contaminación, los frascos se etiquetaron con el nombre del punto, coordenadas, la fecha, hora, y la persona responsable.

Para la caracterización climática se analizó los datos registrados en la estación meteorológica Lumbaqui, ubicada en la provincia de Sucumbíos, se encuentra en una altitud de 580m sobre el mar, sus coordenadas son: latitud de 00°02'19"N y longitud de 77°20'02"W.

Se determinó los siguientes parámetros "in situ" conductividad, pH y temperature.

Trabajo en el laboratorio

Las muestras se analizaron en el laboratorio CENTROCESAL Cía. Ltda., en el cual se determinó los siguientes parámetros: alcalinidad, demanda bioquímica de oxígeno, oxígeno disuelto e hidrocarburos aromáticos policíclicos

Materiales

Los materiales que se utilizaron son: balones aforados de 5, 10 y 100 mL, matraces fondo redondo de 25 a 50 mL, micropipetas de 0,5 y de 1,0 mL y probeta de 1000 mL.

Equipos

Los equipos que se utilizaron son los siguientes: baño maría, viales cromatográficos, filtros de 0,45 µm, columna C16, 5 µm, 120 Å, 4,6 x 250 mm (Acclaim ® Polar Advantantage, Dionex, 001480), columna C18, 5 µm, 120 Å, 4,6x250 mm (Acclaim TM 120, Thermo scientific 006893), pre-columna C18, cartuchos de extracción C18, n sistema HPLC Shimadzu equipado con bomba LC-10AD, inyector SIL-10AD, horno CTO-10a, detector UV-VIS SPD-10AV y adaptado con un detector de fluorescencia (puede utilizarse para la cuantificación del acenafteno, fenantreno, prieno, benzo (a) pireno, benzo (g,h,i) perileno), posee un software de integración y reproceso de datos y un rotavapor RE 2000A.

Reactivos

Los reactivos que se utilizaron son: agua purificada grado HPLC (Tipo

1), acetonitrilo grado HPLC, metanol, acetona / hexano (50: 50), estándar mixer.

Índice de Calidad de Agua (ICA)

Para el cálculo del ICA particular se determinaron ecuaciones para cada parámetro físico-química seleccionado ver Tabla 1

Tabla.1 ICA'S particulares para cada parámetro físico-químico

Parámetros	Ecuaciones	Observaciones
pH	$I_{pH} = 10^{0,2335 pH + 0,44}$	Si el pH es menor que 6,7
	$I_{pH} = 100$	Si el pH esta entre 6,7 y 7,3
	$I_{pH} = 10^{4,22 - 0,293 pH}$	Si el pH es mayor que 7,3
Conductividad Eléctrica	$I_{CE} = 540(CE)^{-0,379}$	(CE) Conductividad Eléctrica en μ mhos / cm
Alcalinidad	$I_A = 105(A)^{-0,186}$	(A) Alcalinidad en mg / L $CaCO_3$
Oxígeno Disuelto	$I_{OD} = \frac{OD}{OD_{Sat}} \times 100$	(OD) Oxígeno Disuelto en mg / L y a T. de campo (T_c) (Oxígeno Disuelto) _{sat} mg / L de saturación $T_{sat} = T_c$
DBO ₅	$I_{DBO_5} = 120 DBO_5$	DBO ₅ Demanda Bioquímica de Oxígeno mg / L

Fuente: (NSF, 1970)
Estandarización del método

Para la elección del método de análisis a validar, se consideró

como referencia bibliográfica el método EPA 550.1, con algunas adaptaciones, para la optimización del método.

Se realizaron pruebas previas para la estandarización, ejecutándose en base a las condiciones cromatográficas que consistieron en preparar cinco niveles de concentración (ver Tabla 2), por cada tipo de condición cromatográfica, estableciéndose dos tipos: condición # 1 y condición # 2 (optimización), en las cuales se diferencian: Tipo de columna, Tipo de elución y Presión.

Se realizó corridas independientes de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, para verificar la identidad de cada uno de ellos, mediante la determinación de los tiempos de retención

Protocolo de validación

El laboratorio CENTROCESAL Cía. Ltda. consideró la implementación de la validación del método para determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (EPA 550.1), de acuerdo a que se considera a los HAP'S como indicadores de la calidad de agua, por la mejora en la gestión de calidad y para garantizar la veracidad y reproducibilidad de los resultados.

Procedimiento del método para la determinación de HAP'S

Preparación de los estándares

Material de referencia Certificado (MRC)

Tabla. 2 Concentraciones de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos en cada nivel

#	HAP'S	Nivel 1 µg / L	Nivel 2 µg / L	Nivel 3 µg / L	Nivel 4 µg / L	Nivel 5 µg / L	Nivel 6 µg / L
1	Naftaleno	500	1000	1500	2000	2500	3000
2	Acenaftileno	1000	2000	3000	4000	5000	6000
3	Fluoreno	100	200	300	400	500	600
4	Acenafteno	500	1000	1500	2000	2500	3000
5	Fenantreno	50	100	150	200	250	300
6	Antraceno	50	100	150	200	250	300
7	Fluoranteno	100	200	300	400	500	600
8	Pireno	50	100	150	200	250	300
9	Criseno	50	100	150	200	250	300
10	Benzo (a) antraceno	50	100	150	200	250	300
11	Benzo (b) fluoranteno	100	200	300	400	500	600
12	Benzo (k) fluoranteno	50	100	150	200	250	300
13	Benzo (a) pireno	50	100	150	200	250	300
14	Dibenzo (a,h) antraceno	100	200	300	400	500	600
15	Indeno (1,2,3- c,d) pireno	50	100	150	200	250	300
16	Benzo (g,i,h) perileno	100	200	300	400	500	600

Se preparó la solución certificada a partir de la ampolla de control de calidad, NSI nc 27617, (QCO-135).

Tomándose 1,00 mL de la ampolla y aforándole a 100,0 mL con agua purificada (solución1), posteriormente se tomó 1,00 mL de la solución 1 y se aforó a 5 mL.

Material de referencia (MR)

Soluciones estándar.

Se preparó la solución madre a partir de la ampolla estándar mixer NSI nc 27617, (C-436) Tomándose 1,00 mL de la ampolla y aforándole a 100,0 mL con acetonitrilo. Se puede preparar también con estándares individuales, teniendo en cuenta la pureza del compuesto.

Estándares de calibración

Se preparó cinco niveles de concentración; para generar la

curva de calibración. Tomándose 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mL de la solución madre y aforándole a 10 ml con acetonitrilo, en la Tabla 2 se muestran las concentraciones de cada analito en cada nivel.

Extracción sólido-líquido de la muestra

Acondicionamiento o activación de la fase sólida. Colocando un cartucho C18 para extracción en fase sólida, en un dispositivo Manifold aplicándole vacío; se realizó cuatro lavadas previas a la adición de la muestra: con 5 mL de metanol, 5 mL de acetona / hexano (50: 50), 5 mL de metanol y 5 mL de agua tipo 1, respectivamente, se dejó drenar el cartucho encada lavada excepto en la última lavada ya que el cartucho debe permanecer húmedo, se recolectó los residuos y se eliminó.

Adición de la muestra.

El flujo de paso de la muestra no debe excederse de 5 mL / min. adicionando un volumen total de 1 L por muestra de agua contaminada con HAP`S a la columna de EFS (cartuchos de extracción C18), se dejó drenar completamente, recolectando la fase acuosa, y adicionando 15 mL de acetona hexano (50: 50), a una velocidad aproximadamente de 3 mL / min, finalmente se recolectó en un balón de fondo redondo de 50 mL.

Se Realizó el proceso de evaporación a una temperatura de 38 a 42 °C en el rotavapor, dejando enfriar por algunos segundos, reconstruyendo con 2 mL de acetonitrilo con agitación o ultrasonido, finalmente filtrar (filtros de 0,45 µm) en un vial cromatográfico

Condiciones del HPLC:

Condiciones # 1

Columna: C16, 5 µm, 120 Å, 4,6x250 mn (Acclaim ® Polar Advantage, Dionex, 001480); Fase móvil: acetonitrilo / agua tipo 1.; Elución: gradiente. En el tiempo 0 min, relación 65/35 (acetonitrilo / agua tipo 1) y en el tiempo 60 min, relación 80/ 20 (acetonitrilo / agua tipo 1).; Longitud de ondas del detector UV: 254; Longitud de onda del detector de fluorescencia: Excitación: 280 y Emisión: 389; Volumen de inyección: 2 µL / min.; Sensibilidad: 0,001; Presión: 81-94; Temperatura: 30 °C

Ya que no se obtuvieron los resultados satisfactorios, con estas condiciones cromatográficas se realizó algunas optimizaciones.

Condiciones # 2 (optimización)

Columna: C18, 5 µm, 120 Å, 4,6x250 mn (Acclaim TM 120, Thermo scientific 006893); Fase móvil: acetonitrilo / agua tipo 1; Elución: isocrática, relación 70/30 (acetonitrilo / agua tipo 1); Longitud de ondas del detector UV: 254; Longitud de onda del detector de fluorescencia: Excitación: 280 y Emisión: 389; Volumen de inyección: 2 µL / min; Sensibilidad: 0,001; Presión: 71; Temperatura: 30 °C

Elección y fijación de los parámetros de validación

El laboratorio acreditado CENTROCESAL, implantó los parámetros de validación de acuerdo a la Norma ISO 17025-2005, en conjunto con los criterios de la guía de laboratorio EURACHEM, la documentación disponible y la experiencia del laboratorio en el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los parámetros de validación escogidos son: selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión (reproducibilidad y repetibilidad), exactitud, incertidumbre e intervalo de trabajo ver Tabla 3

Tabla.3 Fijación de objetivos de validación para la determinación de HAP'S

Parámetros	Objetivos
Linealidad / Función Respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste $R^2 \geq 0,990$
Límite de detección	0,001-0,13 $\mu\text{g} / \text{L}$
Límite de cuantificación	0,002-0,44 $\mu\text{g} / \text{L}$
Precisión repetibilidad	% CVr $\leq 5,0 \%$
Precisión reproducibilidad	% CVR $\leq 5,0 \%$
Exactitud	70-120 %
Incertidumbre	% U (K=2) $\leq 35 \%$ en todos los niveles
Intervalo de trabajo	0,05-6,0 $\mu\text{g/L}$

Diseño experimental

Linealidad: Ajustando por día, de la función respuesta instrumental con seis niveles de concentración por tres días.

Exactitud y Precisión: Determinando la recuperación y el coeficiente de variación, del material de referencia enriquecido (MRs) en 3 niveles y de un material de referencia certificado (MRc), esto se realizó cada día por dos días y dos analistas, en condiciones de repetitividad y reproducibilidad.

Muestras (las disponibles para la validación):

Patrones de trabajo a seis niveles de concentración, se preparó cada día.

Materiales de referencia enriquecidos a tres niveles de concentración, se preparó cada día, por dos días.

Material de referencia certificado a un nivel de concentración, se preparó por dos días

El MR es agua enriquecida, a la que se ha añadido un volumen de concentración conocida de solución patrón de trabajo, como se describe a continuación:

1 litro de agua purificada enriquecida se concentró por extracción en fase sólida a 1 mL con acetonitrilo.

Submuestras (Unidades que se procesan por día):

Preparando tres de cada nivel para los patrones de trabajo, lo que supone un total de 18 unidades por día, que por 3 días serán 54 unidades.

Preparando una de cada nivel y cada nivel por triplicado para los MRs, por cada día y cada analista en condiciones de repetitividad y reproducibilidad, lo que supone 18 unidades por día, que por 2 días serán 36 unidades.

Se preparó una de MRc por triplicado por cada día y cada analista, lo que supone 6 unidades por día, que por 2 días serán 12 unidades.

Procesamiento

Realizándose en forma simultánea el análisis de las 18 unidades de patrones de trabajo, de las 18 unidades de MRs y de las 6 unidades de MRc por cada día

Lectura

Se tomó todas las lecturas que produzcan cada submuestra en el sistema de medida (Área del pico que da la señal del analito).

Interpolación y cálculos

Se realizó en la recta de cada día, de las lecturas obtenidas del MRs y del MRC para obtener el cálculo de concentración, sobre muestra

Tratamiento estadístico

Los resultados de la validación tienen el siguiente tratamiento estadístico:

Para la función respuesta, se determinó el grado de ajuste de la curva R^2 y de los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión (pendiente e intercepto) y la región de confianza de la función de respuesta.

Para la precisión, realizando un análisis de varianza simple de los resultados obtenidos se obtiene la desviación estándar de la repetitividad (S_r) y la desviación estándar de la reproducibilidad (S_R) por niveles.

Para la exactitud, se obtuvo el porcentaje de recuperación de los resultados alcanzados en cada

nivel, que aporta con los límites de detección y cuantificación, el intervalo de trabajo y la incertidumbre.

Resultados y Discusión

Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos analizados del río Cuyabeno, fueron comparados con la reglamentación nacional como la Constitución Ecuatoriana, capítulo segundo, Sección sexta Art. 411. y Art. 412 y con el Plan Nacional para el Buen Vivir, Capítulo sexto, Literal 6.10, de las cuales mencionan, la conservación y recuperación de la calidad del agua de los recursos hídricos y una comparación parcial de estos parámetros con el Texto Unificado de Legislación Ambiental (TULSMA) libro VI, Anexo 1, Tabla 3, de los cuales se eligieron estos parámetros al considerar ser los principales para el objetivo de este estudio que son: oxígeno disuelto, potencial de hidrógeno, hidrocarburos aromáticos policíclicos y temperatura.

De igual forma se comparó con normas internacionales que regulan la calidad de agua independientemente del uso, entre estas reglamentación se encuentra la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, de Estados Unidos y México, Título cuarto, Capítulo 3, Art. 133, Las normas EPA (United States Environmental Protection Agency), La Ley de Agua Limpia protección (CWA), Sección 303 (b)

303 (d) y 305 (b), Ley de Protección y Mejoramiento del Medio Ambiente, Decreto 68 – 86 de la Republica de la República de Guatemala, Título III, Capítulo II, Art. 15 , del Perú Ley General del Ambiente, Ley N° 28611 y el Decreto Legislativo N° 1013, Artículo 118 de la Constitución Política del Perú las mismas que indican el control, monitoreo y evaluación de la calidad de agua, mediante análisis de las características físico-químicas y biológicas, para detectar si existe o no contaminación y si es necesario aplicar las medidas pertinente. Estas comparaciones las realizamos debido que al ser el Río Cuyabeno un afluente importante, la posible contaminación de este podría contaminar los recursos hídricos de países que se encuentran en la Amazonía y que reciben influencia directa o indirecta de este recurso natural, un ejemplo de lo acotado fue el derrame de petróleo afectando al río Aguarico el 31 de mayo del 2013, cuya contaminación se extendió hasta Perú y Brasil.

En el presente estudio se determinó la calidad del agua puntual del río Cuyabeno (en los meses de agosto y octubre), ya que los parámetros que se evaluaron, son fundamentales en la determinación de la calidad del agua, no se realizaron más muestreos y análisis por un mayor tiempo y abarcando

un área mayor debido al presupuesto y logística utilizada en la investigación, sin embargo cabe destacar que es un aporte importante para un estudio continuo que debería ser realizado en esta zona.

Según las normas de calidad ambiental y de descargas de efluentes: recursos agua (TULSMA) establece que la temperatura adecuado para preservar la flora y fauna en aguas dulces calientes debe ser máximo de 32 °C, los valores obtenidos en el río Cuyabeno se encuentran dentro de lo establecido, ya que al ser un río de una zona cálida es adecuado para fines de preservación de la fauna del sector. En cuanto al oxígeno disuelto presente en el agua del río los valores encontrados en los 5 puntos de toma de muestra tanto en el mes agosto como en el mes de octubre tienen una media de 6,39 y 6,37; por tanto se encuentran por una unidad sobre los mínimo requerido, según el TULSMA. Los valores de la demanda bioquímica de oxígeno se compararon con la legislación peruana, ya que para la Tabla 3, Libro VI, Anexo 1 del TULSMA (Ecuador), no contempla este parámetro. Este sobrepasa, triplicando el límite permisible de 15 mg / L; esto es un indicativo de un

Tabla.4 Datos de los análisis físico-químicos obtenidos el 15 de agosto del 2013

Cód.	Temp. °C	pH	C.E. $\mu\text{S} / \text{cm}$	Alcalinidad. mg / L (CaCO ₃)	OD mg / L	DBO ₅ mg / L	HAP'S $\mu\text{g} / \text{L}$
A01	25	5,60	21,20	76,00	6,30	41,33	N.D
A02	22	5,65	7,30	72,40	6,40	42,16	N.D
A03	25	5,80	7,10	77,50	6,45	42,99	N.D
A04	23	5,80	6,30	74,00	6,40	42,16	N.D
A05	22	5,60	6,80	75,00	6,40	41,33	N.D
* N.D: No detectado							

Tabla.4 Datos de los análisis físico-químicos obtenidos el 10 de octubre del 2013

Cód.	Temp. °C	pH	C.E. $\mu\text{S} / \text{cm}$	Alcalinidad. mg / L (CaCO ₃)	OD mg / L	DBO ₅ mg / L	HAP'S $\mu\text{g} / \text{L}$
A01	24	5,60	10,31	76,30	6,40	41,33	N.D
A02	23	5,85	10,74	72,50	6,30	41,33	N.D
A03	23	5,85	11,80	78,10	6,35	41,33	N.D
A04	24	5,62	9,88	73,10	6,45	42,99	N.D
A05	24	5,62	10,90	75,20	6,35	42,16	N.D
* N.D: No detectado							

posible aumento de materia orgánica y esto podría generar a futuro que los niveles de oxígeno disuelto disminuyan. Tomando en cuenta que el valor obtenido del pH del río es ligeramente ácido, ya que presenta valores entre 5,60 a 5,85 en todos los puntos de toma de muestra; al presentar valores menores a los límites permisibles (6,5 - 9) establecidos por el TULSMA, esto podría ser indicativo del aumento de ácidos orgánicos provenientes de la descomposición de la materia orgánica presente en el agua, ver Tablas 3 y 4.

Índice de calidad del agua particular

Se resolvió determinar particularmente los índices, para una evaluación global del ICA, se valoró los resultados obtenidos de los diferentes puntos de toma de muestra, mediante los Índices de Calidad de Agua particulares (ICAS

particulares), para poder valorar numéricamente las condiciones ambientales específicas del río, ver Tabla 6 están expresado en una escala de porcentaje desde 0 (pésimo) hasta 100 (óptimo) para determinar la calidad del parámetro establecido, también se determinó la calidad del agua del río Cuyabeno y de esta manera detectar si existe una posible contaminación y su grado.

El Índice de Calidad de Agua del oxígeno disuelto (IOD) presenta valores de 90,77 en el mes de agosto y de 90,48 en octubre, este parámetro define en gran parte la biodiversidad y la supervivencia de la comunidad ecológica; según el ICA de la National Sanitation Foundation (NSF) el porcentaje ideal para animales acuáticos es mayor a 67, mientras que mientras que valores menores a 55, afectan adversamente la biodiversidad (Chapman 1996).

Tabla.6 Resultados del Índice de Calidad de Agua de los parámetros físico-químicos establecidos

Índice de Calidad de Agua (ICA)					
Códig	pH	C.E μS / cm	Alcalin idad. mg / L (CaCO ₃)	OD mg / L	DBO ₅ mg / L
Promed io	5.69	97,4	74,98	6,39	41,99
Agosto					
Promed io	5.71	107,3	75,04	6,37	41,83
Octubr e					
Índices					
Particul ar	58.6	95,22	47,04	90,77	9,70
(agosto)	9				
Índices					
Particul ar	58.3	91,79	47,03	90,48	9,73
(octubr e)	3				
ICA					
(AGOS TO)			57,03		
ICA					
(OCTU BRE)			56,42		

La conductividad eléctrica refleja la mineralización y la presencia de sales en el agua (Río & García, 2010) , el Índice particular determinado (ICE) dio valores de 95,22 y 91,79 respectivamente en los dos meses.

El IDBO5 presenta valores de 9,70 en el mes de agosto y 9,73 en el

mes de octubre, se determinó este parámetro debió a que es un indicador de la existencia de materia orgánica biodegradable, representando cuantitativamente la contaminación generada por materia orgánica (Davis & Cornwell, 1998).

El Índice particular de la alcalinidad muestra valores de 47,04 en el mes de agosto y 47,03 en el mes de octubre, este parámetro es un indicador de la cantidad de iones bicarbonato que existen en el recurso hídrico.

Los valores obtenidos del Índice de Calidad de Agua del pH son 58,69 y 58,33, este parámetro es considerado como un potencial indicador de la calidad del agua y del grado de afección del agua por agentes contaminantes.

El Índice de la Calidad del Agua global del río Cuyabeno, obtuvo valores de 57,03 en el mes de agosto y 56,42 en el mes de octubre, según SEMARNAP, 1999 los valores obtenidos se encuentran en el rango de poco contaminado generalmente en este tipo de aguas existe menor diversidad de organismos acuáticos y el crecimiento de algas aumentado.

Estandarización del método

En la presente investigación se estableció como estandarización a la optimización de las condiciones cromatográficas, los parámetros que se consideraron son:

La columna ya que en su interior se localiza la fase estacionaria, su composición, no reacciona con ninguna fase, es donde se efectúa la separación de los analitos y también permite la aparición de estos, en diferentes tiempos de retención para así ser fácilmente identificados (Alfonso, 2008).

Elución es el proceso por el cual todos los solutos migran por la columna, puede ser isocrática (los compuestos eluyen usando una fase móvil de composición constante), es simple y barata, o elución por gradiente (los diferentes compuestos eluyen modificando gradualmente la composición de la fase móvil), reduce el tiempo de retención y puede llevarse a cabo de forma lineal o escalonada.

Presión debe lograr un flujo constante y reproducible.

Los resultados encontrados para las condiciones # 1 y # 2 muestran que tienen comportamientos ligeramente diferentes en términos de los criterios estadísticos; debido a que el coeficiente de correlación al cuadrado de las condiciones # 1 no cumple con lo estipulado en los objetivos de validación, de tal manera no posee una adecuada linealidad, consecuencia de esto su línea base no es óptima, también se evaluó la separación entre picos, pero no fue la más satisfactoria ya que el fluoreno y el acenaftileno, no se lograron separar correctamente

Las características de las condiciones # 1 son: columna C 16,

elución gradiente y presión variable; ya que con estas condiciones no se pudo obtener los resultados esperados, se realizó la optimización con las siguientes características: columna C18, elución isocrática y presión constante (condición # 2).

Para las condiciones # 2 se obtuvo un coeficiente de correlación al cuadrado acorde a lo estipulado, una línea base adecuada y una correcta separación entre picos, razones por la cual, se decidió realizar este ensayo con las condiciones del HPLC # 2, tal como fue especificado en el procedimiento del método.

Parámetros de validación

Se realizó un estudio de validación para la determinación cuantitativa de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas de consumo humano, por extracción líquido-sólido y HPLC con detector ultravioleta y de fluorescencia, se pudo observar el desarrollo y el cumplimiento de cada uno de los parámetros establecidos.

Se desarrollaron los procedimientos estadísticos de los parámetros de validación: linealidad, límites de confianza, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, intervalo de trabajo e incertidumbre, evaluándoles a cada uno de estos con los respectivos criterios de aceptación, basándose en los objetivos planteados.

Función de respuesta / linealidad

La linealidad o función respuesta, corresponde a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta (área). Se realizó la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta, en cada día y de cada analito, de esta manera se estableció el comportamiento de la variable dependiente (área) con respecto a la variable independiente (concentración), también se determinó la pendiente y el intercepto.

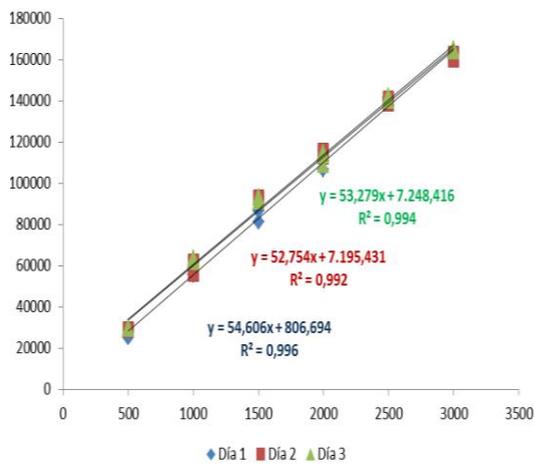
El coeficiente de correlación al cuadrado es considerado como un índice estadístico que mide la relación lineal entre la dos variables cuantitativas (Área y concentración), es decir que determina si existe o no, variabilidad entre las variables; si el R² es cercano a 1 posee una correlación positiva casi perfecta (no existe variabilidad significativa entre las variables), por ende existe una relación directa entre las variables, eso significa que son directamente proporcional, cuando la concentración aumenta el área también aumenta.

El coeficiente de correlación lineal (R²) de cada analito, obtenido en cada día de análisis, se encuentra en el rango de 0,990 a 1,00, por lo tanto el R² encuentra dentro del objetivo establecido con respecto a la linealidad, ya que le valor establecido es de mayor o igual a 0,990. También se comprobó la linealidad de la función de respuesta del método, calculando el porcentaje de recuperación, de los

estándares en los seis niveles concentraciones de cada uno de los HAP'S.

Los valores obtenidos del porcentaje de recuperación del naftaleno se encuentran desde 85,21 hasta 105,84; ver gráfico 1 del acenaftileno, se encuentra desde 93,70 hasta 102,21; del fluoreno se encuentra desde 94,35 hasta 102,30; del acenafteno se encuentra desde 90,45 hasta 103,60; del fenantreno se encuentra desde 99,26 hasta 100,76; del antraceno se encuentra desde 95,66 hasta 102,07; del fluoranteno se encuentra desde 96,73 hasta 102,17; del pireno se encuentra desde 96,53 hasta 102,63; del criseno se encuentra desde 96,212 hasta 103,63; del benzo (a) antraceno se encuentra desde 97,65 hasta 104,73; del benzo (b) fluoranteno se encuentra desde 95,80 hasta 102,63; del benzo (k) fluoranteno se encuentra desde 98,73 hasta 101,59; del benzo (a) pireno se encuentra desde 96,79 hasta 101,32; del dibenzo(a,h)antraceno se encuentra desde 93,18 hasta 106,47; del indeno (1,2,3- c,d) pireno se encuentra desde 97,02 hasta 102,55 y del benzo (g,i,h) perileno se encuentra desde 95,84 hasta 103,17; demostrando que el porcentaje de recuperación de cada analito, cumple con el objetivo de validación propuesto ya que todos los valores se encuentran dentro del rango de 70 a 120 %.

Gráfico .1 Curvas de calibración de los tres días (Concentración vs Área) del naftaleno



También se evaluó los porcentajes de los coeficientes de variación de la repetibilidad y la reproducibilidad de cada uno de los analitos, para determinar si existe similitud entre los datos en condiciones constantes o variadas, se obtuvo un porcentaje menor o igual al 5 %, cumpliendo con lo estipulado.

Límites de confianza

Los límites de confianza predicen la zona donde se espera encontrar el valor verdadero, con un 95% de probabilidad, por ello ha sido importante la determinación de los límites que presentó tanto la ordenada como la pendiente en el análisis de linealidad, de este modo se corroboró que los valores con los que se trabajaron en este estudio se encuentran dentro de estos límites (Tabla 7)

Límite de detección y cuantificación

Se determinó el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) de cada analito, teniendo en cuenta

que el LD es la cantidad mínima detectada, en cambio el LC es la cantidad mínima que puede ser determinada cuantitativamente y posee una precisión aceptable.

Tabla.7 Limite de confianza de los 16 HAP'S

Compuesto	m _{max}	m _{min}	L _{omax}	L _{omin}
Naftaleno	56,509	50,218	12135,154	-2898,608
Acenaftileno	38,401	36,826	8742,294	2607,390
Fluoreno	202,200	189,430	5307,524	1072,942
Acenafteno	29,418	27,111	4654,372	-206,299
Fenantreno	439,962	416,238	5165,804	-1119,712
Antraceno	583,579	553,493	6426,964	299,677
Fluoranteno	145,354	131,636	3739,370	-383,710
Pireno	137,491	123,188	4827,360	1303,276
Criseno	511,510	476,433	6312,501	-4465,546
Benzo (a) antraceno	321,348	277,167	4457,840	-5145,171
Benzo (b) fluoranteno	331,585	306,942	8406,789	-1459,087
benzo(k) fluoranteno	218,079	198,223	5589,148	1292,177
Benzo (a) pireno	214,889	191,015	3780,780	-1268,207
Dibenzo (a,h) antraceno	96,718	86,189	3019,718	-1367,370
Indeno (1,2,3, c-d) pireno	302,780	265,896	4641,806	-5299,317
Benzo (g,i,h) perileno	133,947	113,349	7501,252	-4038,272

Los límites de detección y de cuantificación obtenidos se encuentran dentro de los rangos especificados en los objetivos de validación; con los resultados obtenidos se pudo determinar que el método es capaz de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas: de naftaleno, acenaftileno, fluoreno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo (a) antraceno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (a) pireno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno (1,2,3- c,d) pireno y benzo (g,i,h) perileno en una muestra, siempre q tengan concentraciones igual o mayor a: 0,44 µg / L; 0,02 µg / L; 0,002 µg / L; 0,31 µg / L; 0,05 µg / L; 0,01 µg / L; 0,01 µg / L; 0,07 µg / L; 0,02 µg / L; 0,04 µg / L; 0,01 µg / L; 0,04 µg / L; 0,04 µg / L; 0,03 µg / L;

0,08 $\mu\text{g} / \text{L}$ y 0,25 $\mu\text{g} / \text{L}$ respectivamente.

Precisión

La precisión del método expresa el grado de concordancia que tienen los resultados entre sí, se evaluó mediante dos ensayos: la repetibilidad (precisión obtenida con las mismas condiciones de operatividad, mismo día y mismo analista) y reproducibilidad (precisión obtenida con diferentes condiciones de operatividad, días distintos y analistas diferentes), tanto para el material de referencia enriquecido en los tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) como para el material de referencia certificado.

Para el cálculo de los porcentajes de los coeficientes de variación se determinó las desviaciones estándares de repetibilidad y de reproducibilidad, las cuales presentaron valores pequeños, esto nos indica que los datos están agrupados muy cercanamente a la media.

Los porcentajes de los coeficientes de variación de repetibilidad y de reproducibilidad de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, no presentan dispersión entre los datos, ya que los resultados obtenidos no sobrepasaron al 5 %, cumpliendo con los objetivos planteados, demostrando así que el método es preciso.

También se realizó una prueba de significancia, empleando el cálculo

de F de Fisher, en la cual se planteó una hipótesis alternativa ($H_1 =$ existe diferencia entre días y analista) y una hipótesis nula ($H_0 =$ no existe diferencias entre días y analista), obteniendo como resultado que de la F_{Tab} es mayor que la F_{cal} en todos los analitos, rechazando la hipótesis alternativa, y afirmando que no existe diferencias significativas entre días y entre analistas es decir que los datos presentan similitud entre ellos.

Exactitud

La exactitud es la proximidad en la relación entre un resultado obtenido en el método y el valor de referencia aceptado, por lo cual se calculó el porcentaje de recuperación de tres concentraciones distintas (nivel bajo, medio y alto) del material enriquecido y de una concentración del material de referencia certificado para la verificación del método.

El porcentaje del naftaleno, acenaftileno, fluoreno, acenafteno, fenantreno, antraceno fluoranteno, pireno, criseno, benzo (a) antraceno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (a) pireno, dibenzo (a,h) antraceno, indeno (1,2,3-c,d) pireno y benzo (g,i,h) perileno recuperado muestra que el método es exacto, es decir que los valores obtenidos en la determinación se encuentra próximos al valor verdadero; ya que los resultados se encuentran entre el rango establecido, ninguno es mayor a 120 o menor que 70 % en cada analito, cumpliendo así, con los objetivos de validación.

Incertidumbre

La incertidumbre de un método analítico expresa la dispersión de los valores que puede ser atribuido al mesurado, los valores obtenidos en los tres niveles de cada analito no superan el valor establecido en los objetivos de validación ($\leq 35\%$). Como se puede observar en la Tabla 3.11, el mayor valor de incertidumbre relativa obtenido, en los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, corresponde al nivel bajo

Conclusiones

De acuerdo a los parámetros físico-químicos como temperatura, pH, conductividad, alcalinidad, oxígeno disuelto, DBO5, y HAP'S, se podría concluir en términos generales para este estudio puntual que son aptos para el desarrollo de la fauna y flora.

De acuerdo al índice de Calidad de Agua del río Cuyabeno 56.73 se puede concluir que es poco contaminado.

Se Estandarizó el método EPA (Environmental Protection Agency) 550.1 para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas de consumo humano, por extracción líquido-sólido y HPLC con detección ultravioleta y fluorescencia.

Se estableció que las condiciones óptimas, son las condiciones cromatograficas # 2, ya que presenta las mejores características en los criterios valorados.

Se Validó el método EPA 550.1 determinando y demostrando el cumplimiento de los siguientes parámetros: selectividad, sensibilidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), estimación de la incertidumbre, límites de detección y cuantificación, intervalo de trabajo, linealidad y exactitud del método, según lo establecido por el EURACHEM.

El método es lineal ya que presenta un coeficiente de correlación al cuadrado mayor o igual a 0,990 en los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, esto nos indica que posee una alta relación entre la concentración de los analitos y el área.

El límite de detección para los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentran en el rango establecido de 0,001-0,13 $\mu\text{g} / \text{L}$ en aguas de consumo humano, demostrando que el método puede detectar cantidades pequeñas de estos compuestos.

El límite de cuantificación para los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentran en el rango establecido, lo cual indica que el método puede cuantificar cantidades desde 0,002-0,44 $\mu\text{g} / \text{L}$ con exactitud y precisión.

El método es exacto ya que el porcentaje de recuperación de los 16 HAP'S está entre 70 y 120%, ninguno es mayor a 120% o menor de 70% en cada una de las concentraciones.

El método demostró ser preciso ya que se obtuvieron resultados del porcentaje de coeficiente de variación para la repetibilidad menor o igual 5 % y el coeficiente de variación para la reproducibilidad menor o igual al 5 % en cada analito, cumpliendo con lo establecido.

La incertidumbre expandida (U) para un K = 2 correspondiente al 95 % de confianza en los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, presenta valores menores al 35 %, cumpliendo con lo estipulado.

Se estableció reportes de validación del método EPA 550.1 para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas de consumo humano, por extracción líquido-sólido y HPLC con detección ultravioleta y fluorescencia.

No se encontró concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP'S) en el río Cuyabeno, lo que nos indica que no existe contaminación por estos compuestos.

Referencias

Agudelo, E. A. (2010). Un método de gestión ambiental adecuado para el tratamiento y la disposición final de un residuo peligroso caso: tierra fuller contaminada con aceite dieléctrico. Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Master en en Medio Ambiente y Desarrollo, Universidad nacional de Colombia. Medellín, Colombia, 17.

Alfonso, M. M. (2008). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Proyecto de titulación previa a la obtención del título de Doctor en la facultad de Veterinaria y departamento de farmacología, Universidad de Santiago de Compostela, España, 45.

Ching, Y.-P., Aiken, G., & KM, D. (1997). Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environ Sci Technol*, 31, 1630-1635.

Davis, M., & Cornwell, D. (1998). Series in Water Resources and Environmental Engineering. En M. Hill, *Introduction to environmental engineering* (pág. 224). ISBN.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (1993). *Wethead protection: a guide for small communities*. Office of research and development office of water. Washington DC.

Eurachem. (2005). *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito, Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Los Cués: LGC (Teddington) Ltd,.

Fajardo, P., & Heredia, M. G. (2009). El Caso Texaco: un trabajo por la restitución de derechos colectivos y de la naturaleza. Quito : ABYA-YAL.

FLACSO, Petroecuador . (2003). Petróleo y desarrollo sostenible en Ecuador. "Las reglas de juego" . Quito, Ecuador : RISPERGRAF.

Garavito, M. J. (2006). Determinación de la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el material particulado emitido por fuentes móviles en la localidad de Puente Aranda de la ciudad de Bogotá. Proyecto de titulación previa a la obtención del Título de Ingeniero Ambiental y Sanitario, Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.

Norma Internacional (NTE INEN-ISO/IEC 17025). (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. ISO/CASCO.

Lipscomb, T. P., Harris, R. K., Reba, A. H., Ballachey, B. E., & . Haebler, R. J. (1996, June). Pathological Studies of Sea Otters. Marine Mammal Study 6-1 1. Final Report. Exxon Valdez Oil Spill, 1-17.

Rodríguez, C. A. (2009). Los convenios de la OIT sobre seguridad y salud en el trabajo: una oportunidad para mejorar las condiciones y el medio ambiente de trabajo . Turín: Copyright .

San Sebastián, M., Armstrong, B., & Stephens, C. (2001). La salud de mujeres que viven cerca de pozos y estaciones de petróleo en la Amazonía ecuatoriana. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health, 9(6), 375-384.

SEMARNAP. (1999). Compendio básico del agua en México. México: CNA.

Torres, D. K., & Zuluaga, M. T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Proyecto de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Ingeniería Química.