

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

ESCUELA DE QUÍMICA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA EPA 8015C
PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO
EN MUESTRAS DE AGUA Y SUELOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES**

NATALIA MARÍA AGUILAR CHINCHILLA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

DEDICATORIA

A Dios, por ser la principal fuerza de mi marco de referencia y en cuyas manos está siempre puesta mi confianza. A mis padres, por ser mi claro ejemplo de trabajo, esfuerzo y sacrificio, por ser mis alas y enseñarme que podemos ser libres, a través del conocimiento. A mi hermano, porque en la carrera de la vida y lo profesional, ha sido siempre el sitio seguro al que puedo llegar, a bili y a tío porque hoy soy reflejo de su amor y cuidado y a Elías, porque en la discusión de lo que es la química, también aprendimos a discutir lo que es la vida. Mi corazón es suyo, los amo.

Ad maiorem Dei gloriam

AGRADECIMIENTOS

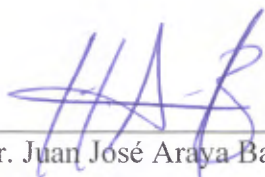
Mi agradecimiento profundo y sincero para el laboratorio AGQ Lambda por brindarme las herramientas y el espacio para culminar este trabajo y permitirme un lugar donde además de desarrollar mi conocimiento, pude hacer crecer mi experiencia profesional durante todo este proceso.

Al Dr. Carlos León Rojas, la Guía y Dirección de este trabajo, profe: gracias por haberme permitido el privilegio de su consejo, por extender su confianza en mi trabajo a lo largo de estos años de conocernos y por ser un pilar fundamental durante mi crecimiento profesional, que Dios le retribuya siempre su gran corazón y pueda ser canal de mi profundo agradecimiento.

A mis asesores, M. Sc. Jeff Briceño Castillo y Dr. Eddy H. Gómez Ramírez por su guía profesional y compromiso con este trabajo y por enseñarme a través de su conocimiento y servicio a la ciencia, que siempre podemos contribuir desde nuestro espacio a la protección y conservación del ambiente.

A mis compañeros y compañeras de AGQ Lambda por brindarme siempre su apoyo y ayuda incondicional durante este proceso y, sobre todo, su amistad a lo largo de estos años.

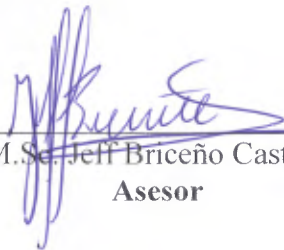
Este proyecto de graduación ha sido aceptado por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Química.



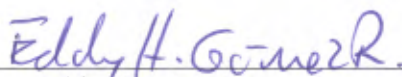
Dr. Juan José Araya Barrantes
Director
Escuela de Química



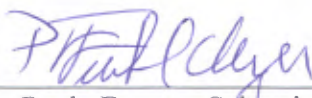
Dr. Carlos León Rojas
Director de TFG



M.Sc. Jeff Briceño Castillo
Asesor



Dr. Eddy H. Gómez Ramírez
Asesor



M.Sc. Paola Fuentes Schweizer
Miembro del tribunal



Natalia María Aguilar Chinchilla
Candidata

ÍNDICE GENERAL

Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	iv
Índice general	v
Resumen	vii
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Justificación	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
Capítulo 2: Marco teórico	5
2.1 Hidrocarburos derivados del petróleo	5
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos	7
2.1.2 Número de carbonos equivalentes	9
2.2 Productos derivados del petróleo	11
2.2.1 La gasolina	12
2.2.2 El diésel	13
2.2.3 Óleos	13
2.3 Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH)	13
2.4 Contaminación por TPH	15
2.4.1 Propiedades de los hidrocarburos que contribuyen a la contaminación	18
2.4.1.1 Solubilidad en agua	18
2.4.1.2 Coeficiente de partición carbono – agua	18
2.4.1.3 Biodegradación	19
2.5 Técnicas para la determinación de TPH	20
2.6 Proceso de validación del método	22
2.6.1 Parámetros de desempeño de la validación analítica	23
2.6.1.1 Intervalo lineal	23
2.6.1.2 Precisión	23
2.6.1.3 Veracidad	23
2.6.1.4 Límites de detección y cuantificación	24

2.6.1.5 Sensibilidad	24
2.6.1.6 Selectividad	25
2.6.1.7 Incertidumbre de medición	25
Capítulo 3: Sección Experimental	26
3.1 Metodología	26
3.2 Reactivos e insumos	26
3.3 Equipamiento	27
3.4 Materiales de referencia	28
3.5 Optimización de las condiciones instrumentales	28
3.6 Preparación de las muestras	29
3.6.1 Matriz agua	29
3.6.2 Matriz suelo	29
3.7 Extracción de muestras	30
3.7.1 Matriz agua	30
3.7.2 Matriz suelo	31
3.8 Análisis de muestras ambientales	32
Capítulo 4: Resultados y Discusión	33
4.1 Optimización del método	33
4.2 Validación del método	39
4.2.1 Linealidad	43
4.2.2 Límite de detección y cuantificación	47
4.2.3 Precisión	49
4.2.3.1 Repetibilidad	50
4.2.3.2 Precisión intermedia	50
4.2.4 Veracidad	51
4.2.5 Sensibilidad	52
4.2.6 Selectividad	54
4.3 Determinación de TPH en muestras ambientales	54
Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones	60
Capítulo 6: Referencias	66
Anexos	76
Anexo 1	76
Anexo 2	77
Anexo 3	78

RESUMEN

Se validó e implementó la metodología 8015C Compuestos Orgánicos no halogenados por cromatografía de gases de la *US Environmental Protection Agency*, EPA, para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en las fracciones del rango orgánico del diésel (DRO) desde C₁₀ hasta C₂₈ y del rango orgánico del aceite (ORO) desde C₂₈ hasta C₄₀ para las matrices de aguas y suelos ingresadas al laboratorio AGQ Lambda.

Para esto se optimizaron las condiciones instrumentales del método logrando identificar los factores críticos que incidían directamente con su desempeño, como el programa de temperaturas, el ajuste de las ventanas de tiempo de retención y el uso de estándares de calibración representativos. Esto permitió alcanzar los resultados esperados según las necesidades en materia ambiental del sector industrial.

Para todos los parámetros de desempeño analizados en la validación se lograron alcanzar los criterios de aceptación planteados por la norma EPA 8000D, tomada como referencia, linealidad ($R^2 \geq 0,99$); precisión ($DER \leq 20\%$); veracidad en porcentaje de recuperación [(70 – 130) %]; límites de detección y cuantificación para suelos y aguas ($\leq 10 \text{ mg L}^{-1}$ y $\leq 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente) y sensibilidad ($m > 0$).

Finalmente, el método validado se aplicó a todas las muestras de agua y suelos ingresadas al laboratorio entre los meses de junio - diciembre del 2020, donde se pudo constatar que una gran mayoría superaba los límites máximos permitidos por reglamentación nacional para aguas de vertido en cuerpos receptores (10 mg L^{-1}) y para suelos de diferente uso [(61 - 100) mg L^{-1}] y que, por lo tanto, la metodología demostró ser una herramienta de potencial utilidad para el monitoreo y remediación de zonas contaminadas con este tipo de sustancias en el país.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I	Materiales de referencia certificados utilizados para las pruebas preliminares, optimización de las condiciones instrumentales y validación de la metodología EPA 8015C.	28
Cuadro II	Condiciones instrumentales programadas en el GC-FID para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo en el rango DRO y ORO.	29
Cuadro III	Programas de temperatura estudiados para la optimización de las condiciones de trabajo de la metodología de TPH en el ámbito de DRO y ORO.	35
Cuadro IV	Pruebas fisicoquímicas realizadas para la determinación de la calidad del Diésel 50 presentadas por ARESEP en el año 2020.	42
Cuadro V	Concentraciones seleccionadas para la preparación de la curva de calibración de DRO y ORO.	43
Cuadro VI	Coefficientes de determinación (R^2) obtenidos en el análisis de mínimos cuadrados de las curvas de calibración de DRO y ORO.	44
Cuadro VII	Límites de detección y cuantificación obtenidos de acuerdo con la guía Eurachem (Eurolab, 2016) para DRO y ORO en las matrices analizadas.	47
Cuadro VIII	Desviación estándar relativa (% DER) obtenida para DRO y ORO en los tres niveles de concentración estudiados en condiciones de repetibilidad.	50
Cuadro IX	Desviación estándar relativa (% DER) obtenida para DRO y ORO en los tres niveles de concentración estudiados en condiciones de precisión intermedia.	51
Cuadro X	Porcentajes de recuperación obtenidos para DRO y ORO en los tres niveles de concentración estudiados.	52
Cuadro XI	Resumen de las condiciones instrumentales definidas en el GC-FID para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo en el rango DRO y ORO.	60
Cuadro XII	Resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño y su correspondiente criterio de aceptación en la matriz de aguas subterráneas.	61
Cuadro XIII	Resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño y su correspondiente criterio de aceptación en la matriz de aguas residuales.	62
Cuadro XIV	Resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño y su correspondiente criterio de aceptación en la matriz de suelos.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de los principales grupos que conforman los hidrocarburos del petróleo.	7
Figura 2	Mapa del petróleo según número de carbono y punto de ebullición.	10
Figura 3	Proceso de transporte, transferencia de masa y atenuación que ocurre en el suelo después de un derrame de combustible.	16
Figura 4	Equipo GC-FID marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 con automuestreador utilizado para la determinación del rango DRO y ORO.	27
Figura 5	Sistema de extracción empleado para las muestras de agua, utilizando diclorometano como disolvente.	30
Figura 6	Materiales utilizados en la extracción de la matriz de suelos: (a) suelo arenoso brindado por el laboratorio, (b) baño de ultrasonido utilizado para la extracción.	32
Figura 7	Diagrama de Pareto utilizado para identificar los principales factores instrumentales que inciden en el tiempo de corrida del análisis.	34
Figura 8	Cromatograma obtenido para el estándar de marcaje FTRPH / Ventana de tiempo de retención medido bajo las condiciones de la rampa #1.	36
Figura 9	Cromatograma obtenido para el estándar de marcaje FTRPH / Ventana de tiempo de retención medido bajo las condiciones de la rampa #7.	36
Figura 10	Señales cromatográficas obtenidas para un estándar mixto de n-decano (C ₁₀) y n-tetracontano (C ₄₀) medidos en las condiciones de temperatura de la rampa #7.	37
Figura 11	Señal cromatográfica obtenida para el patrón mixto de DRO – ORO en una concentración de 3000 mg L ⁻¹ medida en las condiciones óptimas de temperatura.	38
Figura 12	Curvas de calibración y gráficos de residuales para la cuantificación de (a) DRO nivel bajo, (b) DRO nivel alto, (c) ORO nivel bajo y (d) ORO nivel alto.	46
Figura 13	Señales del patrón mixto de DRO y ORO a diferentes concentraciones: (a) Blanco, (b) 100 mg L ⁻¹ , (c) 500 mg L ⁻¹ , (d) 4000 mg L ⁻¹ .	53
Figura 14	Rangos de concentración obtenidos para DRO en las muestras analizadas de aguas subterráneas y aguas residuales en el período junio – diciembre 2020.	55
Figura 15	Rangos de concentración obtenidos para DRO en las muestras analizadas de suelos en el período junio – diciembre 2020.	56

Figura 16	Rangos de concentración obtenidos para ORO en las muestras analizadas de aguas subterráneas y aguas residuales en el período junio – diciembre 2020.	57
Figura 17	Rangos de concentración obtenidos para ORO en las muestras analizadas de suelos en el período junio – diciembre 2020.	57
Figura 18	Rangos de concentración obtenidos para la determinación de TPH en algunas muestras analizadas de aguas subterráneas durante el período junio – diciembre 2020.	58
Figura 19	Rangos de concentración obtenidos para la determinación de TPH en algunas muestras analizadas de suelo durante el período junio – diciembre 2020.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

US EPA*	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
TPH*	Hidrocarburos totales de petróleo
GRO*	Rango orgánico de la gasolina
DRO*	Rango orgánico del diésel
ORO*	Rango orgánico del aceite
PAH*	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno, xileno
VOC*	Compuestos orgánicos volátiles
GC*	Cromatografía de gases
FID*	Detector de ionización de llama
MS	Detector de masas
UVCB*	Productos de reacción compleja y composición desconocida o variable
EC	Equivalentes de carbono
TPHWG*	Grupo de trabajo para los criterios de hidrocarburos totales de petróleo
PHC*	Hidrocarburos del petróleo
NAPL*	Líquido en fase no acuosa
IR	Infrarrojo
SW-846	Compendio de metodologías de residuos peligrosos
RECOPE	Refinadora Costarricense de Petróleo
ARESEP	Autoridad Reguladora de los Servicios Públicos

*Siglas en idioma inglés.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

Costa Rica cuenta con una amplia normativa en materia de protección ambiental y planeamiento de la sostenibilidad (PEN, 2019), sin embargo, *El Informe de Estado de la Nación 2018* planteó que, aunque el país es eficaz en el uso de los recursos naturales para el impulso de su desarrollo, es débil para controlar los efectos residuales e impactos de su uso (PEN, 2018). Esta consecuencia es visible en temas de consumo energético, situación hídrica y gestión del suelo, y se acentúa principalmente en zonas donde la cercanía e invasión de actividades productivas comprometen los recursos.

A lo largo del tiempo, muchos estudios han detallado con mayor exactitud episodios de contaminación en aguas por compuestos como metales y plaguicidas debido a la intensidad de las actividades agrícolas en el país, como por ejemplo, el caso reportado por el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional (UNA) en ríos y cuerpos de agua en Batán de Limón en el 2018 o la contaminación con bromacil en las siete fuentes de agua que abastecen la asada de Pital de San Carlos en la zona norte, reportado por el Laboratorio de Análisis Ambiental de la UNA (PEN, 2019); sin embargo, se han dejado de percibir y documentar otros eventos de impacto ambiental que repercuten directamente en el estado óptimo de recursos naturales como el agua y el suelo.

Tal es el caso de los hidrocarburos totales del petróleo, sustancias que se encuentran inmiscuidas en productos de uso cotidiano, como la gasolina, el diésel, el aceite, el búnker, entre otros. (Public Health Service, 1999; WHO, 2011)

Estos compuestos resultan ser los contaminantes que con mayor frecuencia se detectan en el ambiente (Collins, 2007) y su toxicidad ha sido reportada para muchos organismos (Bence, 2004; Weisman, 1998) incluyendo la salud en los seres humanos, tanto en exposición por fuentes de agua de consumo como por inhalación y absorción dérmica. Muchos compuestos volátiles, incluyendo los hidrocarburos policíclicos aromáticos, PAH, generan severos efectos al interactuar con estas fuentes de agua (Augulyte *et al.*, 2008) y sedimentos. (Bert *et al.*, 2009)

A lo largo del tiempo se han publicado diferentes normativas que contemplan valores máximos permitidos para sustancias contaminantes en aguas y suelos como el Decreto No. 37757-S, *Reglamento sobre valores guía en suelos para descontaminación de sitios afectados por emergencias ambientales y derrames* y el Decreto No. 33601 *Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales*, los cuales se han fundamentado en valores guías planteados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para que cada país los adopte según su situación socioeconómica e hidrológica (Mora, 2018). Sin embargo, es una realidad que la mayoría de los países ha hecho uso de estos valores sin haber realizado una investigación epidemiológica relacionada con la calidad del agua. (Mora, 2018)

En este sentido, monitorear y fortalecer los controles en materia de hidrocarburos resulta vital para el cumplimiento de políticas ambientales y de salud. Sectores como el transportista y energético encuentran en los hidrocarburos derivados del petróleo su principal herramienta de funcionamiento y estas actividades sumadas a cualquier otra donde se requiera su uso, envuelven riesgos de contaminación por mala disposición, fugas en tanques de

almacenamiento o derrames accidentales (Bansal, 2008). Estos eventos son los causantes de la filtración de sustancias específicas como la gasolina, el diésel y el búnker en suelos y sedimentos, que posteriormente llegan a alcanzar mantos acuíferos y otros cuerpos receptores. (WHO, 2011; Rozaimahh, 2020)

En Costa Rica, a pesar de que la contaminación por petróleo ha sido ampliamente estudiada y evidenciada para los litorales Caribe y Pacífico (Acuña-González, *et al.*, 2004) aún no se cuenta con un plan de contingencia formal que involucre derrames petroleros en aguas territoriales, situación que podría extenderse también a los suelos. (Arceyut-Morales & Torres-Alvarado, 2019)

Así mismo, aunque el país es pionero en el uso de energías renovables, el sector transporte sigue manteniendo una tendencia al alza en el uso de combustibles fósiles, tendencia que se refleja en los aproximadamente 19 millones de barriles de petróleo que arriban al país hacia la Refinadora Costarricense de Petróleo (RECOPE) anualmente (Zamora-Quirós, 2017) y ante dicha situación, no es una sorpresa que se hayan presentado numerosas situaciones de derrames y fugas tanto en los tanques de almacenamiento como en los propios buques navieros.

Por otra parte, y como una problemática que se ha extendido a nivel nacional en los últimos años se encuentra el robo de combustible en los oleoductos nacionales. De noviembre del 2016 a agosto del 2019, RECOPE registró 530 tomas ilegales, cuyo valor sustraído alcanzó los ₡7500 millones, con un volumen cercano a los 15 000 m³ de combustibles entre los que se destacan el diésel, Jet-A1, gasolinas súper y Plus 91, lo que equivale a 446 camiones cisterna. (RECOPE, 2019)

Toda esta situación ha desencadenado gran preocupación a nivel económico y ambiental, principalmente por las zonas que ya han sido afectadas y por el costo de remediación que implicará su recuperación, pero también porque con el paso del tiempo, muchos cuerpos receptores de agua y suelos dedicados al uso agrícola e industrial se podrán ver contaminados con este tipo de sustancias.

Por estas razones, y por las estrictas regulaciones ambientales que determinan los valores máximos admisibles para dichos compuestos (Bansal, 2008) se vuelve determinante la realización de este tipo de investigaciones, que permitan medir, a través de metodologías técnicas competentes, el impacto ambiental de forma eficaz.

De esta manera, la presente validación coloca al servicio del país un análisis de alta calidad para el control de aguas y suelos afectados por contaminación con hidrocarburos, incluyendo la problemática del robo de combustibles y la necesidad de subsanar sus consecuencias, así como el establecimiento de parámetros que pueden ser de interés como guía para la normativa nacional.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Implementar y validar la metodología EPA 8015C para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en muestras de agua y suelos utilizando la técnica de cromatografía de gases con FID.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1.2.2.1 Optimizar las condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases con detector FID para la medición de muestras de agua y suelos en el rango orgánico del diésel (DRO) y el rango orgánico del aceite (ORO).
- 1.2.2.2 Evaluar los parámetros de desempeño que correspondan al método normalizado modificado según especificaciones técnicas.
- 1.2.2.3 Aplicar el método validado a un número limitado de muestras reales de suelos y aguas que ingresan al laboratorio AGQ Lambda para probar su efectividad.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Hidrocarburos derivados del petróleo

El petróleo es una mezcla compleja formada por cientos de hidrocarburos que van desde compuestos orgánicos ligeros, de cadena corta, hasta compuestos pesados de cadenas largas y ramificados (Drozdova *et al.*, 2013). Aunque el carbono (80 – 87) % y el hidrógeno (10 – 15) % son los elementos más abundantes de su composición, también se ubican otros elementos como el azufre (0 – 10) %, el nitrógeno (0 – 1) % y el oxígeno (0 – 5) % que se encuentran en su forma elemental, como constituyentes heterocíclicos o como parte de grupos funcionales. (Botello *et al.*, 2005)

Por lo general, dentro de su composición, los hidrocarburos suelen contener compuestos saturados de cadena lineal (alcanos), compuestos alicíclicos (cicloalcanos) y compuestos aromáticos, con al menos un anillo bencénico en su estructura molecular (Gennadiev *et al.*, 2015). En el caso de los alcanos, estos además de su forma lineal, pueden encontrarse como isoalcanos de cadena ramificada de la forma (C_nH_{2n+2}) y con átomos de carbono desde C_1 hasta C_{40} . (Botello *et al.*, 2005)

Por encima de los trece carbonos, el grupo más importante de cicloalcanos es constituido por los hidrocarburos isoprenoides, conformados por unidades de isopreno, siendo el pristano (C_{19}) y el fitano (C_{20}) los más abundantes en el petróleo. (Bekins *et al.*, 2020)

Por su parte, los hidrocarburos aromáticos conformados por uno o más anillos bencénicos en su estructura molecular, poseen menor abundancia en la composición del petróleo y suelen sufrir alquilaciones cuando se trata de estructuras formadas por dos anillos bencénicos (naftalenos) o tres anillos (antraceno y fenantreno). (Botello *et al.*, 2005)

Por encima de las estructuras moleculares formadas por la unión de más de tres anillos aromáticos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) de amplio estudio ambiental por el nivel toxicológico que representan para la salud humana y los ecosistemas. (Okparanma & Mouazen, 2013)

Por último, se encuentran las cadenas de mayor peso molecular, que se conforman por moléculas mixtas de hidrocarburos con algunos compuestos polares a los que se les denomina asfaltenos. La estructura de los asfaltenos puede estar formada hasta por 20 anillos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos y nafténicos. (Botello *et al.*, 2005)

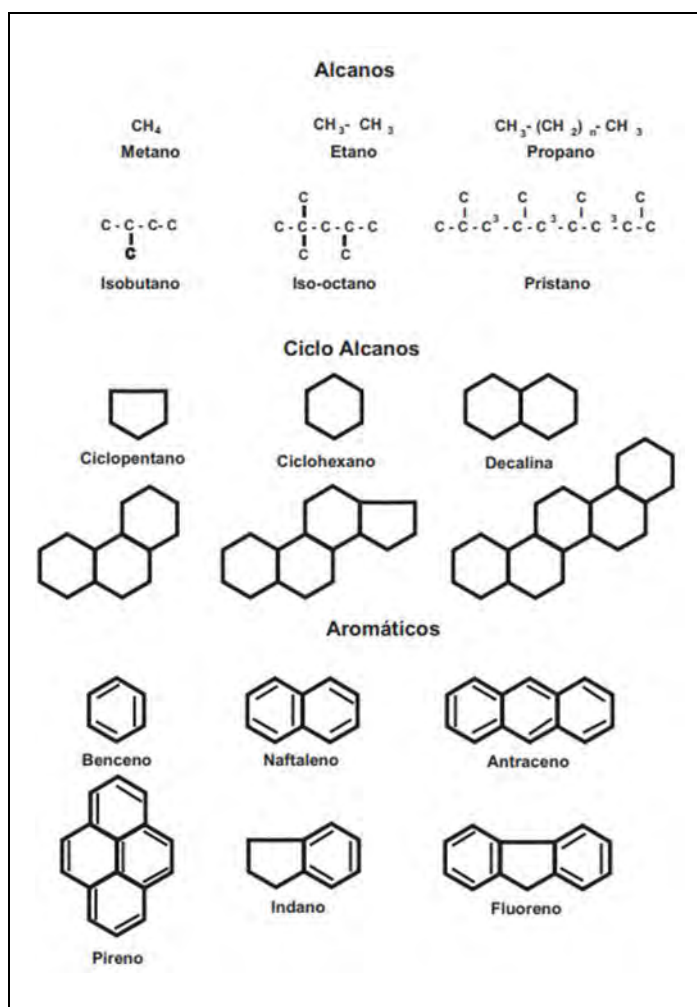


Figura 1. Estructura química de los principales grupos que conforman los hidrocarburos del petróleo.

(Botello *et al.*, 2005)

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos

En cada serie de hidrocarburos, las propiedades físicas varían según el número de átomos de carbono que posea un compuesto (WHO, 2011), por ejemplo, por cada átomo de carbono sumado a una cadena de n-alcanos, su punto de ebullición incrementará en aproximadamente 20 °C.

Así mismo, la polaridad de estos compuestos es una propiedad definida por sus interacciones intermoleculares, de manera que, en el caso de los hidrocarburos aromáticos, estos suelen ser generalmente más polares que los hidrocarburos alifáticos y, por lo tanto, menos volátiles y más solubles en medios como el agua. (Gennadiev *et al.*, 2015)

Debido a la compleja composición que poseen los hidrocarburos, caracterizarlos en términos de su composición, estructura y fórmula molecular resulta una tarea compleja (Bierkens & Geerts, 2014) y por este motivo incluso reciben el nombre reglamentario de productos de reacción compleja desconocida o variable o UVCB.

Por lo tanto, y para facilitar su caracterización, dichas sustancias han sido agrupadas por diferentes reglamentaciones y metodologías en fracciones más sencillas, que siguen patrones regulares como resultado de factores estructurales y donde se considera también su proceso de fabricación y propiedades físicas básicas. (Zemo *et al.*, 2013)

Dichas fracciones están determinadas por propiedades químicas y físicas como la solubilidad, densidad, viscosidad y presión de vapor, y se encuentran tan estrechamente relacionadas, que los isómeros y miembros adyacentes de una serie homóloga de hidrocarburos pueden ser categorizados bajo propiedades toxicológicas, ambientales, de degradación y de destino ambiental. (Bierkens & Geerts, 2014)

Estas propiedades son la base de las medidas de lixiviabilidad y volatilidad de los hidrocarburos individuales, donde, además, utilizando n-alcanos específicos se pueden marcar resultados analíticos de compuestos alifáticos y aromáticos para delimitar a los hidrocarburos dentro de dichas fracciones.

2.1.2 *Número de carbonos equivalentes*

Como se vio anteriormente, agrupar simplifica en gran medida la caracterización de los hidrocarburos según sus propiedades y evolución en el ambiente, por esta razón una característica importante de los métodos analíticos para la determinación de TPH es el uso de un índice de número de carbono equivalente (índice EC, índice ECN o ECNI) que representa los puntos de ebullición equivalentes para cada sustancia y constituye la característica física base para separar los componentes del petróleo a través de los diferentes análisis químicos. (J. G. Speight, 2011)

Bajo este enfoque de fraccionamiento, uno de los criterios más utilizados ha sido el del Grupo de Trabajo de los Hidrocarburos Totales de Petróleo, TPHWG, que indica que el carbono equivalente (EC) de cualquier hidrocarburo se basa en la comparación de su punto de ebullición con el compuesto de referencia n-hexano. (Pindado Jiménez *et al.*, 2015)

Generalmente y dado que los compuestos derivados del petróleo cubren un amplio rango de puntos de ebullición y número de carbonos, suelen clasificarse en *mapas del petróleo*, contruidos en término de estos dos parámetros (J. Speight, 2015), como se observa en la Figura 2.

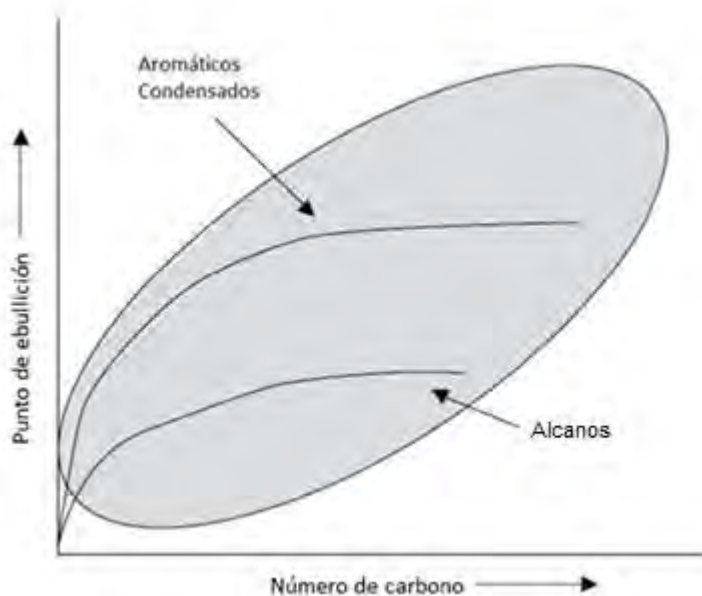


Figura 2. Mapa del petróleo según número de carbono y punto de ebullición. (J. Speight, 2015)

De esta manera muchos grupos de investigación simplifican y delimitan los rangos de medición de los hidrocarburos según el enfoque con el que trabajen, aunque este modelo de división por fracciones también involucra asumir un factor de variabilidad cuando se trata de comparar con otras metodologías, puesto que los resultados se vuelven muy dependientes de la norma de referencia (ASTDR, s.f). A pesar de esto, cuando las comparaciones se realizan entre fracciones consistentes sí es posible alcanzar buenos índices de repetibilidad. (Johnson *et al.*, 2004)

En el caso de esta investigación, las fracciones de petróleo fueron definidas por el estándar EPA 8015C, la cual ubica dos fracciones particulares, el rango orgánico de la gasolina (GRO) entre el grupo de alcanos C_6 hasta C_{10} , con puntos de ebullición entre $(60 - 170) ^\circ C$ y el rango orgánico del diésel (DRO) correspondiente al rango de alcanos entre C_{10} y C_{28} en un rango de puntos de ebullición entre $(130 - 430) ^\circ C$.

La norma amplía su alcance para otras fracciones siempre que se cuente con el equipo y el respaldo analítico para cuantificarlas, por lo que, por adaptación del método también se trabajó con el rango orgánico del aceite (ORO) correspondiente al rango de alcanos entre C₂₈ y C₄₀.

Con base en esto, es importante indicar que, una vez definidas las fracciones de trabajo y por el alcance de la metodología utilizada, los rangos en los cuales se enfocó la investigación abarcan únicamente DRO y ORO, ya que el rango de GRO requiere de equipo instrumental y técnicas especializadas en compuestos volátiles, como por ejemplo inyección por *headspace*.

2.2 Productos derivados del petróleo

Del crudo de petróleo se obtiene una gran variedad de productos de uso común, tanto de consumo a pequeña y gran escala. Todos estos productos se encuentran de igual forma constituidos por mezclas complejas de cientos de hidrocarburos y sus propiedades son otorgadas por la fuente desde la cual se extrae el crudo y las prácticas de refinación utilizadas. (Weisman, 1998)

Generalmente, y a excepción de pocas filtraciones superficiales, el crudo de petróleo yace bajo la superficie terrestre y se extrae únicamente por perforación (Weisman, 1998). Su proceso de refinado inicia con un lavado para la eliminación de sales y otros compuestos inorgánicos y posteriormente se destila para obtener un amplio rango de fracciones, desde el metano hasta el asfalto.

Durante el proceso de refinación, el petróleo es dividido en fracciones de punto de ebullición similar, que posteriormente son modificadas por procesos de craqueo, condensación,

polimerización y alquilación para formar productos comerciales como la nafta, la gasolina, el diésel y otros fuelóleos. (J. Speight, 2015)

La composición de estos productos puede variar según la refinería involucrada, la época del año, la variación en los aditivos, entre otros factores, y muchas veces la exposición ambiental y el almacenamiento a la intemperie también introducen una variable de modificación biológica que interfiere con la composición de los productos derivados del petróleo. (Gennadiev *et al.*, 2015)

2.2.1 La gasolina

La gasolina es una mezcla compleja de hidrocarburos volátiles del petróleo, aditivos y agentes de mezcla. Su composición varía ampliamente de acuerdo con la composición del crudo desde el cual se refinó y muchas de sus propiedades funcionales son establecidas según mercados específicos y reglamentaciones locales. (Weisman, 1998)

Esta mezcla contiene principalmente hidrocarburos en el rango $C_4 - C_{12}$, distribuidos típicamente de la siguiente forma (porcentajes en masa): alcanos (4 – 8) %, alquenos (2 – 5) %, isoalcanos (25 – 40) %, cicloalcanos (1 – 4) % y aromáticos (20 – 50) %. En esta distribución se destaca el benceno, con una presencia entre (0,12 – 3,5) %. (J. Speight, 2015)

Otros componentes presentes suelen ser agentes antidetonantes como el tetraetilo de plomo, agentes eliminadores de plomo como el 1,2-dibromoetano, detergentes, agentes antioxidantes y agentes que evitan el hielo, como los alcoholes. Muchos productos adicionados también tienen la función de aumentar el octanaje, incluidos el etano y el metil ter-butyl éter, MTBE. (Weisman, 1998)

2.2.2 *El diésel*

El diésel forma parte de los destilados del petróleo conocidos como destilados del medio o medios, porque poseen puntos de ebullición mayores a los de la gasolina, pero menores a las fracciones del gasóleo o aceites. El rango de temperaturas de ebullición que cubre se encuentra generalmente entre los (175 – 375) °C y posee un número de carbonos entre C₈ y C₃₀. Su composición depende generalmente de la naturaleza del crudo y su proceso de refinamiento. (Briker & Ring, 2001)

2.2.3 *Óleos*

La fracción oleosa suele estar compuesta por aceites minerales lubricantes y su índice de hidrocarburos suele encontrarse entre C₁₅ y C₅₀. Estos hidrocarburos suelen ser una mezcla de alcanos lineales, ramificados, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos, aunque también es posible encontrar hidrocarburos aromáticos policíclicos cuando los aceites han sido expuestos a tiempos prolongados de uso. (J. Speight, 2015)

2.3 **Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH)**

A diferencia de otros términos como el de *Hidrocarburos de Petróleo*, PHC por sus siglas en inglés, que hace referencia a todos los compuestos que contienen hidrógeno y carbono originarios del crudo de petróleo, el término TPH se diferencia porque se encuentra intrínsecamente asociado a investigaciones ambientales y sus resultados consiguientes. En el ámbito de su uso, los TPH son específicos para definir parámetros de exposición final, alteraciones naturales y su destino ambiental. (ASTDR, s.f.)

Los hidrocarburos totales de petróleo, es un término utilizado para denominar a una gran cantidad de sustancias derivadas del crudo de petróleo que se encuentran en el ambiente, y dado que esta sustancia posee una composición muy variada, el término engloba de forma sencilla una mezcla compleja de compuestos. (Public Health Service, 1999)

Históricamente el término se estableció para determinar el grado de contaminación presente en diferentes ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, que permitiera un enfoque común entre agencias y entes reguladores (Weisman, 1998) y dado que el término comprende un rango indeterminado de compuestos, muchas veces su definición se entrelaza con el método analítico con el que se trabaje, dependiendo de los rangos que interprete o sea capaz de detectar. (ASTDR, s.f.)

Estos compuestos, como parte de toda sustancia derivada del crudo de petróleo, están formados por estructuras químicas de bajo y alto peso molecular, incluyendo heteroátomos como el nitrógeno, el oxígeno y el azufre e incluso algunos de los compuestos existen como complejos formados con vanadio, hierro y níquel en su estructura. (Botello *et al.*, 2005)

Estas características son indicio de que el origen, la composición y la calidad del crudo de petróleo dependen de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos como el depósito original de materia orgánica, las condiciones ambientales y su disposición a la biodegradabilidad. (Kanaujia, 2018)

Esto resulta de gran importancia a considerar ya que, aunque la determinación de TPH no es una metodología selectiva, sí implica la visión de una huella dactilar que da indicios del tipo de contaminación presente en una zona.

2.4 Contaminación por TPH

En las últimas décadas, el uso de productos derivados del petróleo ha ido en aumento (Balseiro-Romero *et al.*, 2018) y consecuentemente el riesgo de contaminación en el ambiente. Muchos de estos productos son de uso cotidiano para el ser humano y participan de actividades fundamentales como el transporte, la calefacción, la generación de energía y la producción de materias primas, por lo que no es sorpresa que su presencia en diversos ecosistemas sea sobresaliente sobre otras sustancias de igual preocupación para el ambiente y la salud.

Cuando los hidrocarburos son liberados al ambiente ocurren diversos cambios que afectan significativamente las condiciones del entorno, lo que incluye la captación de recursos naturales para las poblaciones, ya que la contaminación reduce drásticamente el potencial agrícola del suelo y, producto de la lixiviación desencadenada por las lluvias, se ven afectadas también fuentes de agua subterránea y otros afluentes (Abha & Singh, 2012). Muchos de estos compuestos incluso suelen ser altamente persistentes, lo que les permite ser absorbidos por partículas de suelo durante largos períodos de tiempo.

Este tipo de contaminación puede ocurrir en cualquier etapa del procesamiento de hidrocarburos, como la extracción, refinamiento, transporte y almacenamiento, aunque la mayoría de los incidentes ocurren por fugas en tuberías de transporte y deficiencias en los tanques de almacenamiento. (Balseiro-Romero *et al.*, 2018)

Generalmente cuando ocurre una fuga o derrame de petróleo se forma lo que se conoce como un líquido en fase no acuosa (NAPL), como se observa en la Figura 3, que se encuentra influenciado por el volumen derramado, el área afectada, la composición del hidrocarburo,

las propiedades del suelo y las condiciones ambientales del lugar. Todos estos factores son indispensables de analizar para comprender cómo será el comportamiento de los hidrocarburos en dicho medio.

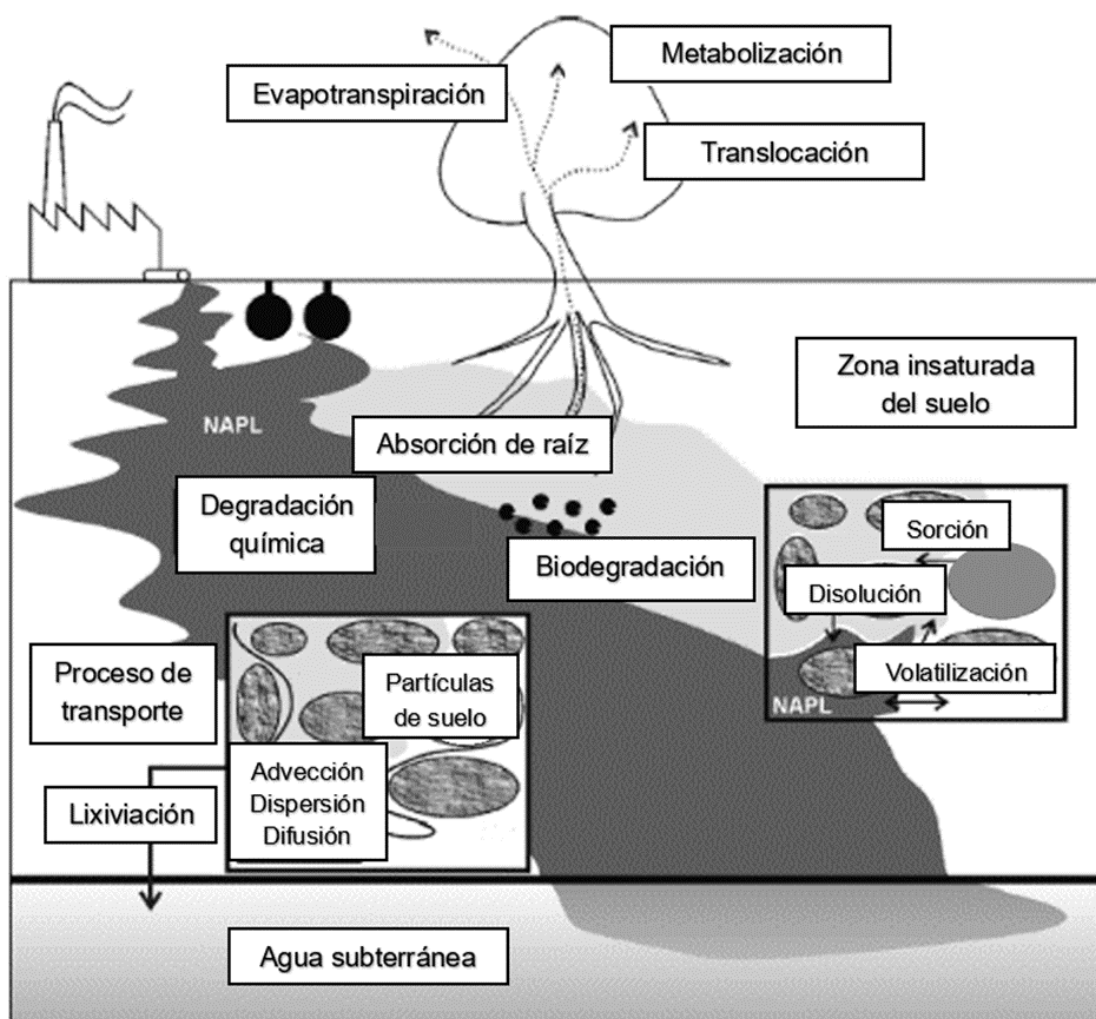


Figura 3. Proceso de transporte, transferencia de masa y atenuación que ocurre en el suelo después de un derrame de combustible. (Balseiro-Romero *et al.*, 2018)

Normalmente cuando estos compuestos forman parte de mezclas complejas, los componentes individuales nunca alcanzan concentraciones predichas a partir de su constante de solubilidad, de manera que, compuestos como el tolueno o el benceno que poseen muy alta toxicidad, tienen una predisposición mayoritaria a mantenerse en las plumas de NAPL (Balseiro-Romero *et al.*, 2018). Los TPH en general, se mueven hacia el suelo o el agua a través de los bordes de estas plumas.

A través de determinaciones de TPH también se han evidenciado cambios en las propiedades del suelo, como disminución de su pH, reducción en la retención de la humedad de hasta un 23% y aumento en el contenido de CO presente, hasta en un 500% (Castellanos *et al.*, 2015). Por otra parte, en las aguas subterráneas se ha observado que los derrames y fugas de hidrocarburos como gasolina y diésel han sido unos de sus principales contaminantes. (Arceyut-Morales & Torres-Alvarado, 2019)

Cuando se presentan estas situaciones, las investigaciones han demostrado que además de los hidrocarburos presentes en las mezclas iniciales, se encuentran en los sitios contaminados otras sustancias producto de su meteorización, de los cuales muchos suelen tener mayor polaridad, por lo que su transporte a través del agua o el suelo, su disposición final y sus propiedades toxicológicas cambian, incrementándose el riesgo de recuperar áreas contaminadas. (Bekins *et al.*, 2020; Wade *et al.*, 2016)

Por ejemplo, existen estudios de biorremediación de PAH que indican mayor toxicidad por parte de los productos de transformación hidroxilados y carboxilados que sus compuestos precursores (Bekins *et al.*, 2020) lo que ha generado discusión en los grupos de investigación sobre la necesidad de cuantificar y evaluar los productos de la degradación.

Por esta y otras razones, conocer la información específica del sitio donde ocurre la contaminación siempre es necesaria para una interpretación correcta de los datos, además de la diferencia en el comportamiento de las sustancias dependiendo del medio en el que se encuentren, por ejemplo, si se trata de aguas superficiales, subterráneas o suelos.

2.4.1 Propiedades de los hidrocarburos que contribuyen a la contaminación

2.4.1.1 Solubilidad en agua

La solubilidad es uno de los factores clave para determinar el comportamiento de los hidrocarburos cuando entran en contacto con el ambiente, ya que, cuanto mayor sea la solubilidad de uno de estos compuestos en agua, mayor será su predisposición para disolverse y extenderse por medio de la lluvia y otros cuerpos de agua desde su punto de liberación. (Balseiro-Romero *et al.*, 2018).

La solubilidad es un parámetro que disminuye conforme aumenta el peso molecular de los compuestos, por lo tanto, los hidrocarburos aromáticos son más solubles y móviles en agua que los alifáticos de cadena lineal y esto les confiere un interés de investigación mayor por el riesgo que representan. (Weisman, 1998)

2.4.1.2 Coeficiente de partición carbono – agua

Otro de los factores involucrados en la distribución de hidrocarburos a través del ambiente es el coeficiente partición de carbono orgánico – agua (K_{oc}), que describe la disposición de un compuesto orgánico de repartirse entre el agua y el carbono orgánico del suelo. (J. Speight, 2015)

Dicha característica permite predecir la movilidad química de una sustancia en función de la probabilidad de dividirse con mayor fuerza entre el carbono orgánico del suelo y el agua. Así, por ejemplo, un compuesto que se encuentre fuertemente asociado o absorbido a un sustrato será relativamente inmóvil y no se lixiviará o transportará grandes distancias desde su área de liberación, caso contrario con sustancias poco o nada absorbidas, donde su potencial de transportarse mayores distancias aumenta. (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2008; Park & Park, 2010)

Este grado de sorción no solo afecta la movilidad del compuesto, sino que también interviene con otros factores como la tasa de volatilización y la biodegradación, que dependen del grado de división. (J. Speight, 2015; Z. Wang & Fingas, 1997)

2.4.1.3 Biodegradación

La biodegradación es un factor importante de considerar puesto que, una vez hecho el contacto de los TPH con el agua o el suelo, los microorganismos presentes en el entorno iniciarán un proceso de degradación dependiente de la composición química del producto liberado y de la morfología específica del lugar, que podrá diversificar las sustancias presentes inicialmente. (Arjoon & Speight, 2020)

Normalmente, los hidrocarburos de cadena lineal y aromáticos se degradan con mayor facilidad que otros compuestos alifáticos, siendo los n-alcanos, n-alquilaromáticos y aromáticos en el rango C₁₀ – C₂₂ los más sencillos de biodegradar. (Riazi, 2005; J. Speight, 2015)

2.5 Técnicas para la determinación de TPH

Existen diversas metodologías de análisis específicas para la determinación de compuestos críticos como los PAH, BTEX y TPH, y aunque la determinación de TPH por sí misma, no brinda información del nivel de riesgo implicado para la salud humana o para el ambiente, sí constituye una herramienta eficaz para detectar la presencia de fugas o derrames en un área, para evaluar la severidad de contaminación de un hábitat o para dar seguimiento al progreso de una remediación (Weisman, 1998). Por eso, más que enfatizar en la comparación o el detalle, los métodos de TPH detallan en el control de calidad. (Pikovskii *et al.*, 2017)

Entre las metodologías más destacadas para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo se encuentran los métodos gravimétricos, de espectro infrarrojo y cromatográficos. En un inicio los métodos de IR fueron los más utilizados, porque resultaban más simples, rápidos y de menor costo, sin embargo, se fue descontinuando por la prohibición de uso del gas freón, que era requerido para la extracción de las muestras. (Liang & Tilotta, 2003; L. Wang *et al.*, 2019)

Por su parte, los métodos gravimétricos, aunque resultan ser los más simples y de rápida aplicación son muy limitados en cuanto a su selectividad para el tipo de combustible analizado. Este método es útil únicamente cuando las concentraciones de hidrocarburos en aguas o suelos son significativamente altas. (Drozdova *et al.*, 2013)

Por estos motivos la técnica más ampliamente desarrollada para el análisis de hidrocarburos ha sido la cromatografía de gases acoplada a diferentes tipos de detectores, entre los que destacan el espectrómetro de masas (GC-MS) y el detector de ionización de llama FID.

La cromatografía de gases es una técnica que ofrece una alta sensibilidad y para el propósito de monitoreo de dichas metodologías permite la detección y cuantificación de hidrocarburos de una manera muy eficiente. (Zubair *et al.*, 2015)

Un aspecto por considerar de las técnicas cromatográficas es el ingreso de los analitos al sistema de detección, debido a su naturaleza volátil, por lo que existen equipos ensamblados con diferentes metodologías de inyección que facilitan este proceso (Saari *et al.*, 2010). Por ejemplo, en el caso del rango orgánico de la gasolina (GRO) es necesario hacer uso de técnicas de inyección más especializadas para compuestos volátiles como *headspace* o *purge and trap*, mientras que en el caso del rango orgánico del diésel (DRO) o el rango orgánico del aceite (ORO) esto no es estrictamente necesario y puede realizarse por inyección simple, con la recomendación de hacer uso de automuestreadores, para mejorar la repetibilidad. (Pérez Pavón *et al.*, 2004)

Esta técnica también se acompaña de diversos métodos de extracción y tratamiento de muestra como el uso de soxhlet, ultrasonido, fluidos supercríticos, microondas, entre otros, para poder concentrar eficazmente los analitos de interés. (Schwab *et al.*, 1999)

La técnica que se escoja depende de factores propios del sistema como la concentración de los analitos y el tipo de matriz que se trabaje, pero también es importante considerar el tiempo del que se disponga para el análisis y el volumen de muestras por medir en análisis rutinarios.

Siempre es muy importante definir el alcance y limitaciones de la técnica de trabajo, porque en el caso de los TPH, una misma muestra evaluada por diferentes métodos, puede generar resultados diferentes, justamente porque su concepto se encuentra muy arraigado a la técnica de aplicación. Por esto, la escogencia del método también depende del propósito de la

investigación y de los requisitos reglamentarios establecidos con los que se trabaje. (Z. Wang & Fingas, 1997)

Una de las metodologías más utilizadas para el estudio de hidrocarburos ha sido el estándar EPA 8015C de la *Environmental Protection Agency*, que permite cuantificar concentraciones para hidrocarburos purgables y extraíbles. El método, al igual que otros, consiste en una extracción inicial de los analitos en las matrices de aguas y suelos utilizando un disolvente no polar y una posterior cuantificación a través de la técnica de cromatografía de gases CG-FID en un rango orgánico eluido entre n-decano y n-tetracontano. (Grosser *et al.*, 1993)

Este método fue seleccionado por el laboratorio por la estructura regulatoria que posee la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y por la solidez de los métodos que componen el compendio SW-846 en el desarrollo de estas metodologías.

2.6 Proceso de validación del método

La validación de un método es el proceso mediante el cual se busca demostrar que un procedimiento analítico es adecuado para un uso previsto. Este implica la realización de una variedad de estudios que evalúan su rendimiento en condiciones definidas (The FEM Method Validation Team, 2005) y proporciona confianza en la calidad y diseño del sistema para generar datos analíticos válidos y útiles.

Las metodologías de la EPA se encuentran diseñadas para abarcar una amplia variedad de objetivos de medición, entre ellos monitorear el cumplimiento de reglamentaciones ambientales y recopilar información a través de estudios científicos y dependiendo de estos objetivos, se ajustan los detalles técnicos, los parámetros de desempeño y los criterios de aceptación. (The FEM Method Validation Team, 2005)

2.6.1 *Parámetros de desempeño de la validación analítica*

Los parámetros de desempeño evaluados en esta validación se seleccionaron con base en la naturaleza del método, las necesidades del laboratorio y los requerimientos de la norma EPA 8015C, de manera que se pudiera dar cumplimiento a los estándares establecidos considerando las posibilidades e intereses del laboratorio. A continuación, se describen los parámetros seleccionados.

2.6.1.1 Intervalo lineal

Es una característica de desempeño que corresponde al ámbito en donde la relación entre la concentración de los patrones de calibración y su respectiva señal instrumental se ajustan a una función lineal, ecuación [1]. (Eurolab, 2016; ASTM E2857-11R16, 2016).

$$y = mx + b \quad [1]$$

2.6.1.2 Precisión

La precisión es una medida del grado de dispersión entre una serie de mediciones (Eurolab, 2016) y se expresa mediante parámetros estadísticos que describen dicha propagación, como la desviación estándar (desviación estándar relativa) calculada a partir de los resultados de mediciones repetidas en condiciones específicas. Así mismo la precisión se estima considerando dos condiciones: (a) la repetibilidad y (b) la precisión intermedia.

2.6.1.3 Veracidad

La veracidad corresponde a la proximidad entre la media de un número infinito de resultados producidos por el método y un valor de referencia (Eurolab, 2016). Generalmente, y al no ser factible realizar mediciones infinitas en un método, la veracidad se expresa

cuantitativamente en términos de sesgo y una práctica común para su determinación son los ensayos de recuperación, haciendo uso de la ecuación [2].

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adición}} \times 100 \quad [2]$$

Donde \bar{x}' corresponde a la concentración medida en la muestra enriquecida, \bar{x} a la concentración medida en la muestra no enriquecida y $x_{adición}$ representa la concentración añadida.

2.6.1.4 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección de un ensayo describe la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada a través de la técnica de medición a un cierto nivel de confianza, mientras que el límite de cuantificación hace alusión a la cantidad más pequeña de analito que puede ser cuantitativamente determinada con una exactitud aceptable (Eurolab, 2016). Sus valores se estiman utilizando las ecuaciones [3] y [4] respectivamente.

$$LD = 3 \times s_0 \quad [3]$$

$$LC = 10 \times s_0 \quad [4]$$

2.6.1.5 Sensibilidad

La sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento correspondiente a una variación de la magnitud medida, es decir, el gradiente de la curva de respuesta. (Eurolab, 2016)

2.6.1.6 Selectividad

La selectividad es un parámetro que describe la habilidad de un procedimiento analítico para determinar un analito o analitos particulares en una matriz sin ser afectado por interferencias de otros compuestos de comportamiento similar. (Eurolab, 2016)

2.6.1.7 Incertidumbre de medición

La incertidumbre de medición es un intervalo asociado a un resultado de medida, que expresa un ámbito de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. (Eurolab, 2016; JCGM, 2012)

CAPÍTULO 3

SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Metodología

Para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo en aguas y suelos por la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector FID (CG-FID) y su correspondiente validación, se siguió el procedimiento descrito por la norma EPA 8015C *Compuestos Orgánicos no Halogenados por Cromatografía de Gases* de la *Environmental Protection Agency* junto con las recomendaciones y lineamientos de su serie homóloga EPA 8000D *Separaciones Cromatográficas Determinativas*.

Se determinaron las fracciones correspondientes al rango orgánico del diésel C₁₀ – C₂₈ (DRO) y al rango orgánico del aceite C₂₈ – C₄₀ (ORO) en aguas subterráneas, aguas residuales y suelos.

3.2 Reactivos e insumos

Durante el proceso de validación del método se utilizó diclorometano para cromatografía como disolvente, pureza 99,8%, marca Merck Millipore, sulfato de sodio anhidro, pureza 99,7%, marca Fermont PA Cert y sílica gel 60 (35 – 70) µm, marca Merck Millipore.

Además, se trabajó con cristalería clase A y equipo volumétrico en los rangos (2 – 20) µL; (10 – 100) µL; (100 – 1 000) µL y (0,500 – 5,00) mL. Todos los reactivos y disolventes se emplearon tal y como fueron recibidos.

3.3 Equipamiento

El sistema GC-FID utilizado para la medición de TPH consistió en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 con automuestreador, acoplado a detector FID, como se muestra en la Figura 4 y columna cromatográfica capilar de alta resolución, marca Agilent J&W DB-5HT Fase 5% phenyl-95% methylpolysiloxane de 30 m de longitud, 0,250 mm ID y 0,25 μm de *film*. Se utilizó el programa TotalChrom Navigator para procesar las figuras cromatográficas y realizar la cuantificación de los analitos.



Figura 4. Equipo GC-FID marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 con automuestreador

utilizado para la determinación del rango DRO y ORO.

Además, se utilizó un baño ultrasónico marca Branson, modelo CPX5800H, una balanza analítica marca VIBRA, modelo LF224, una balanza granataria marca Precisa, modelo 3100D y un rotavapor marca IKA, modelo RE100-pro.

3.4 Materiales de referencia

Los materiales de referencia fueron proporcionados por AGQ LABS & Tech y utilizados tal y como fueron recibidos para la realización de las pruebas preliminares y la optimización del método. Posteriormente se utilizó diésel y aceite comercial caracterizados por la Refinadora Costarricense de Petróleo (RECOPE) y avalados por la Autoridad Reguladora de Servicios Públicos (ARESEP) para las pruebas de validación. Todos los materiales de referencia se detallan en el Cuadro I.

Cuadro I. Materiales de referencia certificados utilizados para las pruebas preliminares, optimización de las condiciones instrumentales y validación de la metodología EPA 8015C.

Nombre	Casa Comercial	Lote
FTRPH / Ventana de tiempo de retención	AccuStandard®, Inc.	213111309
n-decano	DR EHRENSTORFER	G984419
n-tetracontano	DR EHRENSTORFER	G1001185
Diésel 50 comercial	-	-
Aceite Quartz 5000	-	T23254

3.5 Optimización de las condiciones instrumentales

Para la optimización de las condiciones instrumentales se siguieron las recomendaciones de las normas EPA 8015C y EPA 8000D para el método de *Compuestos Orgánicos no Halogenados por Cromatografía de Gases*. Primeramente, se implementó el uso de una columna capilar de alta resolución, marca Agilent J&W DB-5HT Fase 5% phenyl-95% methylpolysiloxane de 30 m de longitud, 0,250 mm ID y 0,25 µm de *film* que permitiera optimizar los tiempos de elución de los analitos. Con esto se buscó además mejorar la intensidad de la señal y la separación de los picos. Las condiciones programadas para el método se muestran en el Cuadro II.

Cuadro II. Condiciones instrumentales programadas en el GC-FID para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo en el rango DRO y ORO.

Condiciones del inyector	
Modo	Split 10:1
Volumen de inyección	2,0 µL
Temperatura inicial	200 °C
Gas de arrastre	Nitrógeno
Flujo de gas	20 mL/min
Condiciones del horno	
Temperatura inicial	60 °C
Programación de temperatura	45 °C/min hasta 380 °C, espera: 9,50 min
Tiempo de corrida	20,61 min
Condiciones del Detector	
Temperatura	380 °C

3.6 Preparación de las muestras

3.6.1 Matriz agua

Las muestras utilizadas para la validación de aguas subterráneas y aguas residuales fueron recolectadas por personal capacitado del laboratorio en botellas ámbar de 1 L y se almacenaron a una temperatura de (4 ± 2) °C previo a su análisis. Posteriormente una porción de las muestras de cada matriz se mezcló en recipientes independientes de mayor volumen, para trabajar con una mezcla de consistencia más homogénea y representativa.

3.6.2 Matriz suelo

Para la validación de la matriz de suelos se trabajó con una muestra específica de suelo brindada por el laboratorio, que consistía en un suelo de consistencia homogénea y arenosa

previamente calcinado por 8 horas a 450 °C para eliminar cualquier rastro de impureza orgánica. Este suelo se conservó a temperatura ambiente durante todo el proceso de análisis.

3.7 Extracción de muestras

3.7.1 Matriz agua

La extracción de las muestras de agua se realizó utilizando embudos de separación y diclorometano como disolvente (Figura 5). Cada muestra fue previamente homogenizada y llevada a temperatura ambiente antes de dar inicio con el análisis. Posteriormente, en probetas adecuadas, se midió 1 L de muestra y se le determinó su masa por diferencia en balanza granataria. Luego se colocó el total del volumen en el embudo correspondiente y se realizaron lavados con diclorometano a la probeta para garantizar que no quedaran remanentes de la muestra adheridos a sus paredes.



Figura 5. Sistema de extracción empleado para las matrices de agua, utilizando diclorometano como disolvente.

Una vez en el embudo de separación, se realizaron tres extracciones con 30 mL de diclorometano cada una, se agitó por un minuto y se esperó el tiempo necesario para que se diera la separación de fases. Posteriormente se recolectó la fase orgánica en un balón de fondo redondo, pasándola por un embudo con un filtro que contenía sílica gel y sulfato de sodio anhidro. Finalmente se concentró la fase orgánica en el rotavapor y se trasvasó el extracto a un vial cromatográfico para su lectura.

3.7.2 *Matriz suelo*

Las muestras de suelo se trabajaron mediante extracción sólido – líquido. Para esto se tomaron aproximadamente 15 g de suelo en un frasco de laboratorio (Figura 6a), se les agregó sulfato de sodio anhidro y se agitó hasta que la muestra se observó arenosa y libre de agua. Posteriormente se les adicionó 60 mL de diclorometano, procurando que el disolvente cubriera por completo el sólido y se colocaron en el baño ultrasónico (Figura 6b) cubiertos con papel aluminio por 15 minutos. Durante esta etapa fue importante verificar que no aumentara la temperatura del baño, para lo cual se adicionaron bloques de enfriamiento dentro del baño.

Pasado este tiempo se decantó el líquido hacia balones de destilación, pasando el extracto por un embudo con papel filtro que contuviera sílica gel en la parte inferior y sulfato de sodio anhidro en la parte superior.

Finalmente, se le realizaron tres enjuagues de 5 mL de diclorometano a los frascos, se concentró todo el filtrado utilizando el rotavapor y se trasvasó el extracto recuperado a un vial cromatográfico.

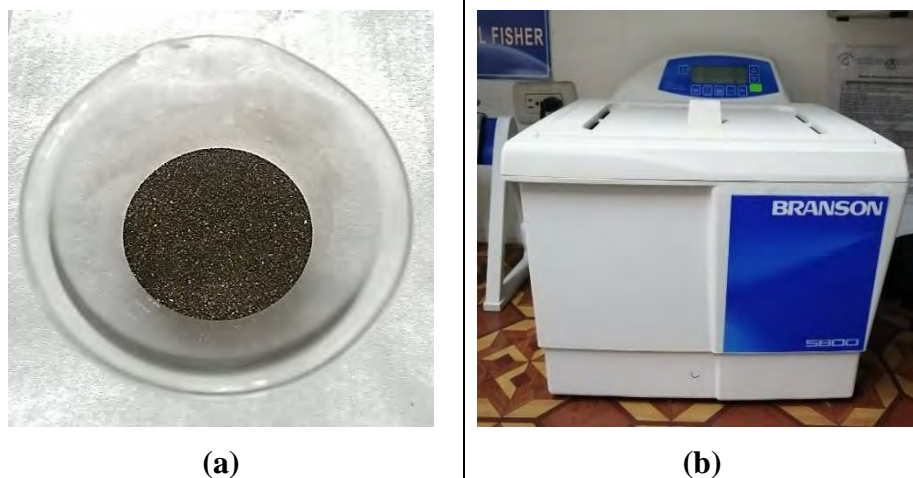


Figura 6. Materiales utilizados en la extracción de la matriz de suelos: (a) suelo arenoso brindado por el laboratorio, (b) baño de ultrasonido utilizado para la extracción.

3.8 Análisis de muestras ambientales

Posterior al proceso de validación, se aplicó la metodología validada a las matrices de aguas y suelo que ingresaron por el sistema de recepción de muestras del laboratorio, entre los meses de junio – diciembre del 2020. AGQ Lambda S.A. recibe muestras de interés ambiental tanto de clientes del sector público como privado que manejan proyectos de remediación ambiental, monitoreo ambiental y otros proyectos de investigación.

Para los respectivos análisis todas las muestras fueron tomadas por personal capacitado, considerando las condiciones óptimas de transporte y se siguieron todos los pasos de extracción y análisis indicados anteriormente para cada muestra por separado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización del método

El primer objetivo de la propuesta de metodología para la determinación de TPH consistió en optimizar las condiciones del método, tanto de la extracción de muestras como de las variables instrumentales.

Muchos estudios de diseño experimental multivariado identifican los principales factores que intervienen en las condiciones de trabajo del equipo, como el volumen de inyección, la temperatura de inyección, la temperatura del detector, el flujo de gas portador, la relación de disolventes y la programación de temperaturas dentro del horno. (Zubair *et al.*, 2015)

De estos factores se ha demostrado que la velocidad de flujo del gas portador y la programación del horno representan los principales puntos por considerar cuando se desea obtener resoluciones óptimas de picos adyacentes en las figuras cromatográficas y mejorar los tiempos de análisis.

La Figura 7 muestra un diagrama de Pareto que ejemplifica cómo la programación del horno se sobrepone a los demás factores cuando se trata de mejorar los tiempos de corrida.

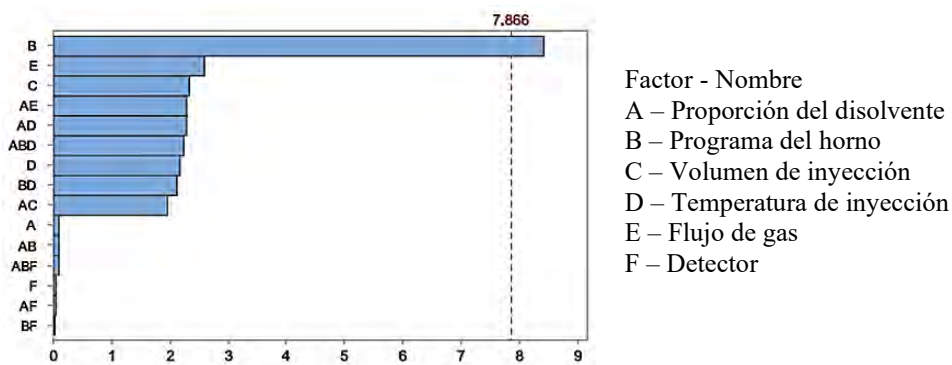


Figura 7. Diagrama de Pareto utilizado para identificar los principales factores instrumentales que inciden en el tiempo de corrida del análisis. (Zubair *et al.*, 2015)

En este sentido, la determinación de TPH por su naturaleza analítica, no requería de una mejora significativa en la respuesta de su señal cromatográfica, pero sí en el tiempo de corrida, desde que su composición comprende analitos en un amplio espectro de puntos de ebullición.

Considerando esta idea y la necesidad comercial de ser eficiente en cuanto a los tiempos de análisis, la optimización se acentuó en la optimización del programa de temperaturas. Uno de los cambios más significativos realizados a la metodología para la optimización de dicho factor fue la adquisición de una columna capilar de amplio rango de temperatura, que permitiera alcanzar límites de hasta 400 °C manteniendo una excelente resolución y sin verse comprometido su funcionamiento, como el modelo DB-5HT, descrito en la sección 3.5. El Cuadro III muestra las pruebas corridas en el GC-FID utilizando el estándar de FTRPH / Ventana de tiempo de retención para la optimización de las condiciones del programa de temperaturas en el horno.

Cuadro III. Programas de temperatura evaluados para la optimización de las condiciones de trabajo de la metodología de TPH en el ámbito de DRO y ORO.

Rampa	T detector (°C)	T inicial del horno	Programa de temperatura	Tiempo de corrida (min)
1	300	40 °C / Espera: 1 min	8 °C/min hasta 360 °C, espera: 15 min	65,00
2	320	50 °C / Espera: 1 min	45 °C/min hasta 360 °C, espera: 15 min	31,89
3	320	50 °C / Espera: 1 min	25 °C/min hasta 360 °C, espera: 5 min	27,40
4	360	50 °C / Espera: 1 min	45 °C/min hasta 380 °C, espera: 15 min	32,33
5	360	50 °C / Espera: 1 min	45 °C/min hasta 380 °C, espera: 5 min	22,33
6	380	60 °C / Espera: 1 min	45 °C/min hasta 400 °C, espera: 7,50 min	20,06
7	380	60 °C / Espera: 1 min	45 °C/min hasta 380 °C, espera: 9,50 min	20,61

Como se observa en el Cuadro III, las rampas programadas inicialmente inducían corridas de hasta una hora de medición, lo que generaba análisis poco viables. Posteriormente se procedió a incrementar la temperatura del horno y a mantener por mayor tiempo a los analitos bajo estas condiciones dentro de la columna. Esto permitió mejorar considerablemente los tiempos de corrida sin comprometer la vida útil de la columna o la figura del cromatograma. La rampa # 7 descrita en el Cuadro III fue la que brindó mejores resultados para correr los siguientes análisis de la metodología.

La Figura 8 muestra un cromatograma del estándar FTRPH / Ventana de tiempo de retención medido bajo las condiciones de la rampa #1, en el que se puede observar saturación del detector y señales traslapadas, en tiempos de corrida cromatográfica muy extenso, mientras que en la Figura 9 se muestra un cromatograma para el mismo estándar bajo las condiciones

de la rampa #7, donde se observa una resolución apropiada de las señales en un tiempo de análisis reducido.

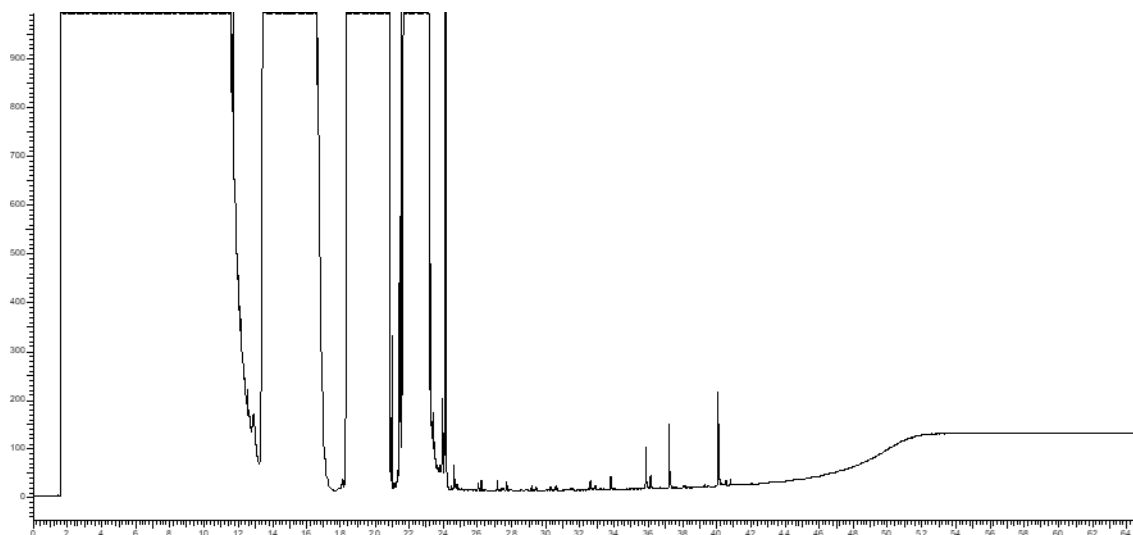


Figura 8. Cromatograma obtenido para el estándar de marcaje FTRPH / Ventana de tiempo de retención medido bajo las condiciones de la rampa #1.

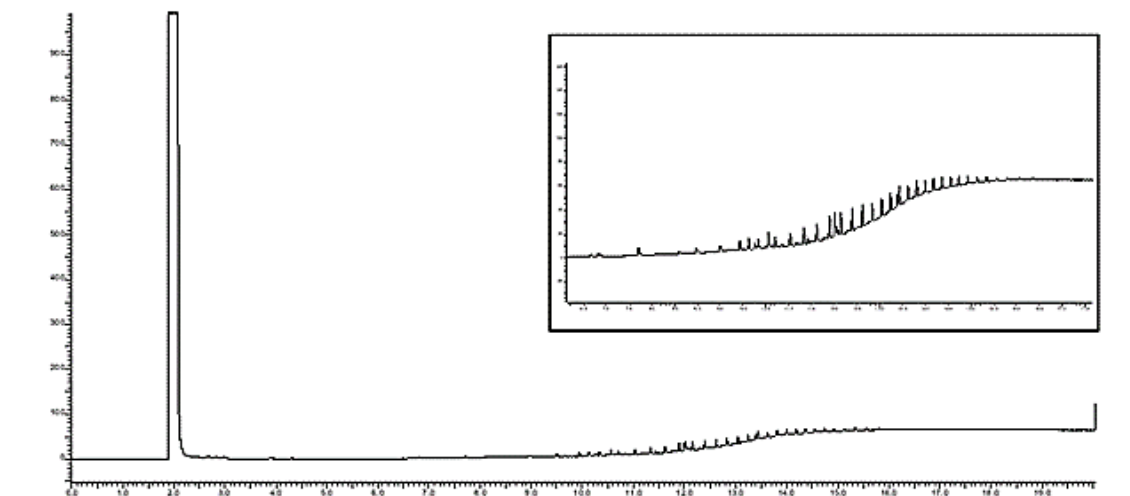


Figura 9. Cromatograma obtenido para el estándar de marcaje FTRPH / Ventana de tiempo de retención medido bajo las condiciones de la rampa #7.

El uso de este estándar junto con los patrones de marcaje n-decano y n-tetracontano también fueron parte de la optimización del método, ya que anteriormente se utilizaba un coctel preparado con una cantidad limitada de alcanos. Este cambio permitió identificar más fácilmente las señales de cada fracción de analito y marcar los tiempos de retención apropiadamente. En la Figura 10 se puede apreciar la elución de los estándares de marcaje n-decano y n-tetracontano, que permitieron la delimitación de las tres fracciones.

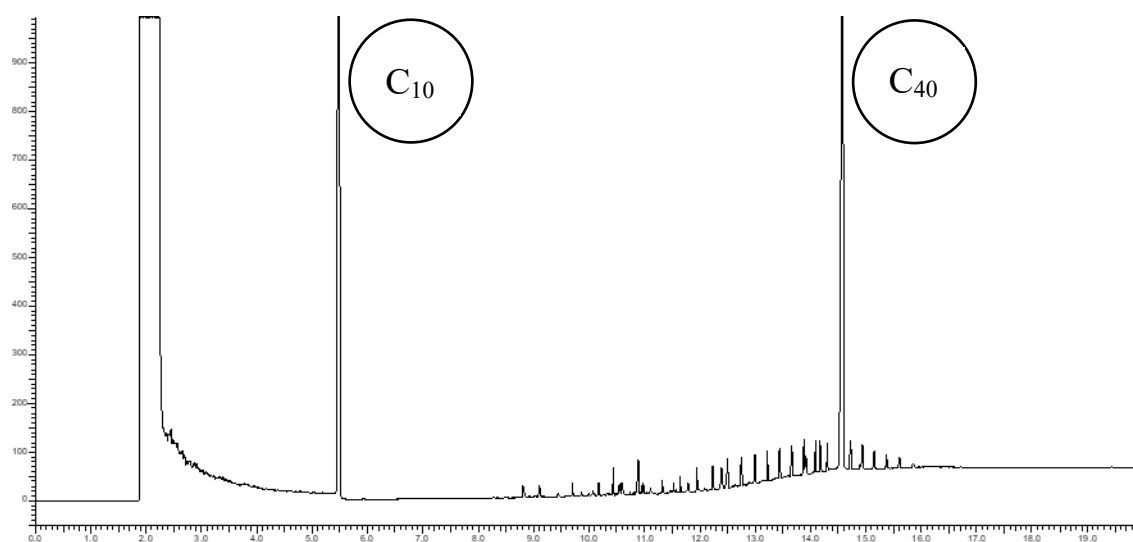


Figura 10. Señales cromatográficas obtenidas para un estándar mixto de n-decano (C_{10}) y n-tetracontano (C_{40}) medidos en las condiciones de temperatura de la rampa #7.

Este estándar de medición especifica que la señal de GC-FID se integra en la ventana de tiempo que comienza inmediatamente después del pico C_{10} hasta el inicio del pico C_{40} en un nivel de señal correspondiente a la línea base frente al pico del solvente. Así con este marcaje, la fracción de TPH de esta medición se determinó como la suma de los hidrocarburos resueltos y no resueltos eluidos entre los tiempos de retención del n-decano y n-tetracontano. (Xie *et al.*, 1999)

En estos análisis las ventanas de tiempo de retención se establecen para compensar cambios originados por cargas de la muestra y la variabilidad propia del sistema cromatográfico (EPA 8000D); sin embargo, deben ser seleccionadas cuidadosamente para no generar falsos negativos o positivos.

Una fuente importante de variación en esta forma de cuantificación se presenta con la integración de ventanas cromatográficas de tiempo muy amplias que poseen baja intensidad de señal, ya que, para el caso de los hidrocarburos, asignar correctamente los límites de integración para dichas señales se vuelve más complejo. (Drozdova *et al.*, 2013)

Para garantizar que la asignación de las señales era correcta y que la metodología era aplicable para los patrones utilizados, se realizaron pruebas a diferentes concentraciones. La Figura 11 muestra un cromatograma para el patrón mixto de DRO – ORO a una concentración de 3000 mg L⁻¹.

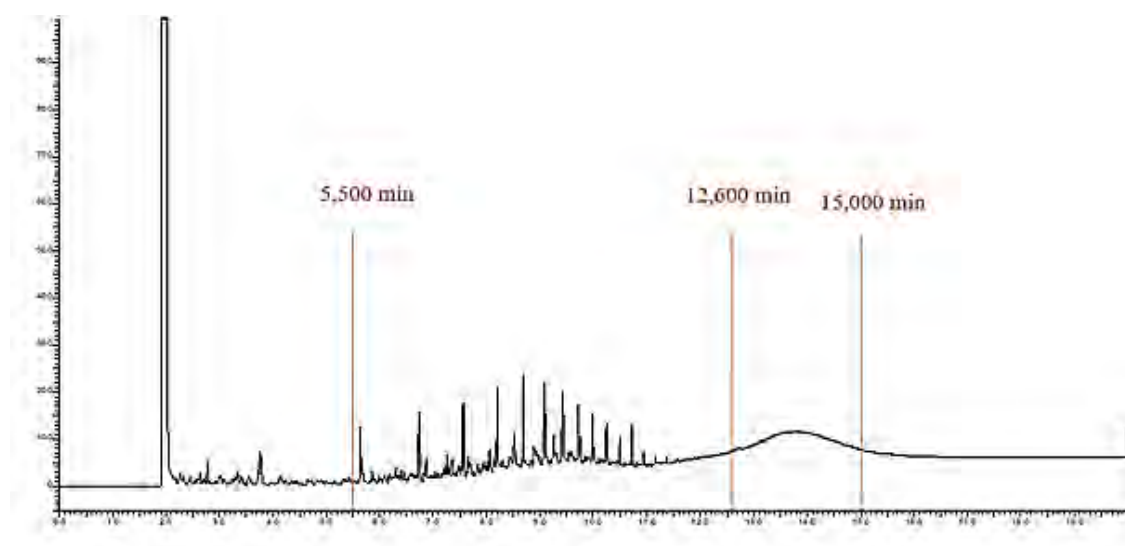


Figura 11. Señal cromatográfica obtenida para el patrón mixto de DRO – ORO en una concentración de 3000 mg L⁻¹ medida en las condiciones óptimas de temperatura.

En este cromatograma la figura característica del diésel (DRO) es apreciable desde los 5,500 min hasta los 12,600 min y la del aceite (ORO) desde los 12,600 min hasta los 15,000 min. Esta huella digital representa la concentración relativa de los hidrocarburos presentes en una muestra particular y con la determinación de los tiempos de retención de cada fracción se facilita su óptima cuantificación.

Finalmente, este análisis también permitió verificar el correcto desempeño del patrón mixto de hidrocarburos DRO – ORO, que se consideró como una optimización más del método, ya que muchas investigaciones sugieren que el uso de estos combustibles comerciales en este tipo de metodologías estrecha la comparación de los posibles componentes que se encuentran en las muestras contaminadas, volviéndolos más representativos. Por lo tanto, con la caracterización de estos combustibles mediante las condiciones cromatográficas establecidas, también se pudo garantizar su estabilidad y huella cromatográfica característica.

4.2 Validación del método

Una vez definidas las condiciones de trabajo se procedió a realizar la validación del método para las tres matrices definidas. El proceso de validación es el que permite demostrar que el procedimiento analítico es adecuado para su uso previsto y facilita el establecimiento de las características de desempeño, sus limitaciones e interferencias durante todas las etapas del análisis. (Eurolab, 2016)

Existen diferentes guías que establecen procedimientos válidos para llevar a cabo un proceso de validación, sin embargo, siempre es importante que el procedimiento se ajuste al tipo de técnica que se trabaje y que los métodos estadísticos utilizados sean representativos de los resultados. Además, en algunas ocasiones es necesario ajustarse a reglamentaciones

específicas a la hora de realizar una validación y por esto, el proceso debe ser planificado considerando todos estos factores.

La presente validación se trabajó siguiendo los lineamientos propuestos por la Guía Eurachem: *La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016)*, desarrollando los parámetros de desempeño indicados en la sección 2.6.1 (del presente trabajo) y considerando los criterios de aceptación de la norma EPA 8000D *Separaciones Cromatográficas Determinativas* que plantea valores meta para los análisis cromatográficos de muchas de las normas del compendio SW-846, de la cual se desprende la norma EPA 8015C. Así mismo se utilizó la guía Eurachem mencionada anteriormente como referencia para los análisis estadísticos presentados.

La validación de la metodología consideró la cuantificación de TPH en el rango orgánico del diésel (DRO) C₁₀ – C₂₈ y el rango orgánico del aceite (ORO) C₂₈ – C₄₀. El rango orgánico de la gasolina no se consideró para esta validación ya que no se contó en dicho momento con el equipo necesario para realizar mediciones apropiadas de la fracción más volátil. Este rango debe ser ampliado en una consiguiente validación para obtener una medida de TPH completa.

En la aplicación de la metodología se utilizaron combustibles comerciales para la preparación de los estándares de calibración. Esto implicó verificar el rendimiento cromatográfico de estas sustancias mediante su resolución y modelar la respuesta del detector en un rango de trabajo muy amplio.

Esta alternativa, sugerida en otras investigaciones y metodologías, incluida la EPA 8015C parte del hecho de que dichos combustibles e hidrocarburos comerciales brindan información más certera sobre el tipo de contaminación presente en un área (Nespeca *et al.*, 2019; Saari *et al.*, 2007) puesto que podrían ser, con mayor probabilidad, los que se encuentren derramados en las zonas contaminadas y dado que la determinación de TPH consiste esencialmente en la cuantificación de una mezcla compleja de compuestos, el uso de estas sustancias permitía acercarse aún más al objetivo de realizar una proyección del tipo de compuestos presentes en una zona.

Si bien el método no es selectivo para cada sustancia de manera independiente, este sí permite evaluar similitudes entre grupos combustibles a través de figuras cromatográficas, lo que brinda indicios de los hidrocarburos presentes en el medio, su forma de meteorización y otras interacciones bioquímicas que puedan tener con el medio, incluso permitiendo evaluar la presencia e interacción de otros subproductos de degradación. (Z. Wang & Fingas, 1997)

Esta forma de evaluar la calibración también partió del hecho de que, en Costa Rica, la calidad de los combustibles supera la normativa regional centroamericana y sus propiedades fisicoquímicas y comerciales son garantizadas por un ente regulador.

Particularmente se destacó la calidad del diésel por su bajo contenido de azufre, curva de destilación, índice de cetano y temperatura de inflamación, establecido en el Programa de Evaluación de Calidad de los Combustibles, mediante el cual la Refinadora Costarricense de Petróleo analiza todos los productos que comercializa. (ARESEP, 2020)

Incluso en la directriz N°56-MINAE del 5 de octubre del 2016 donde se regulan las especificaciones y parámetros de calidad de los combustibles derivados del petróleo

comercializados en territorio nacional, se establece que las especificaciones técnicas del diésel deben cumplir con los Reglamentos Técnicos Centroamericanos y las especificaciones de calidad que establece la norma INTE 41-01-03 (*Combustibles. Diésel. Especificaciones*) y para esto es sometido constantemente a diversas pruebas de rendimiento como la viscosidad, curva de destilación, índice de cetano, punto de inflamación, presencia de agua y/o sedimentos, color, contenido de azufre, entre otros. Algunas de los resultados presentados por la ARESEP para estas pruebas en su último informe se muestran en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Pruebas fisicoquímicas realizadas para la determinación de la calidad del Diésel 50 presentadas por ARESEP en el año 2020.

Parámetro	Resultado
Contenido de agua y sedimentos	< 0,01
Contenido de aromáticos % v/v	16,58
Contenido de azufre (ppm)	13,60
Contenido de cenizas (ppm)	< 0,002
Contenido de Nitrógeno (ppm)	< 0,015
Índice de cetano	53,52
Presencia de agua	Ausente
Presencia de sedimentos	Ausente
Punto inicial de la curva de destilación (°C)	169,47
Punto final de la curva de destilación (°C)	360,02
Residuo de Carbón Conradson	< 0,10
Densidad g/cm ³	833,53
Temperatura de inflamación (°C)	65,52

Todas estas características permitieron garantizar que los patrones comerciales de combustible (Diésel 50 y aceite Quartz 5000) poseen características de desempeño óptimas para su uso y que presentan un desempeño cromatográfico apropiado, por lo que son ampliamente representativos para su uso previsto.

4.2.1 Linealidad

La norma EPA 8015C sugiere el uso de al menos cinco estándares de diferente concentración para la preparación de la curva de calibración; sin embargo, por el amplio rango de concentración que pueden presentar los TPH en una zona contaminada, se decidió trabajar este parámetro con diez estándares de calibración que contenían cantidades definidas de DRO y ORO, de manera que se pudiera cubrir un rango que abarcara desde los límites permitidos para compuestos similares tipificados en la normativa nacional, hasta límites más altos determinados en otras investigaciones. Las concentraciones de trabajo se reportan en el Cuadro V.

Se prepararon varias curvas de calibración para evaluar la señal instrumental en función de la concentración y de esta forma determinar el tipo de relación entre estas variables, verificar el alcance planteado y confirmar la efectividad del procedimiento instrumental.

Cuadro V. Concentraciones seleccionadas para la preparación de la curva de calibración de DRO y ORO.

Nivel	Estándar de calibración	Concentración (mg L ⁻¹)
Bajo	1	5
	2	25
	3	50
	4	75
	5	100
Alto	6	500
	7	1000
	8	2000
	9	3000
	10	4000

Una vez realizadas las lecturas iniciales de la curva y considerando la distribución de los patrones, se decidió dividirla en dos niveles (bajo y alto) para su tratamiento estadístico, ya que, los puntos de la curva se deben distribuir de la manera más uniforme posible. (Eurolab, 2016)

La linealidad del método se evaluó comparando el coeficiente de determinación con el criterio de aceptación indicado por el estándar EPA 8000D ($R^2 \geq 0,99$). Los valores de los coeficientes de determinación obtenidos para las curvas de calibración preparadas se observan en el Cuadro VI.

Cuadro VI. Coeficientes de determinación (R^2) obtenidos en el análisis de mínimos cuadrados de las curvas de calibración de DRO y ORO.

Fracción	Coeficientes de determinación (R^2)		
	Criterio: $R^2 \geq 0,99$		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
DRO (nivel bajo)	0,995	0,997	0,997
DRO (nivel alto)	0,996	0,998	0,996
ORO (nivel bajo)	0,995	0,996	0,996
ORO (nivel alto)	0,995	0,996	0,996

De la información resumida en el cuadro VI se infiere que el modelo matemático que muestra la relación entre la señal y la concentración (ecuación de la recta) se puede utilizar para propósitos cuantitativos. Para complementar este análisis se realizó un contraste estadístico, utilizando una prueba t de dos colas y $n - 2$ grados de libertad; en todos los casos se rechazó la hipótesis nula, es decir, se comprobó que existe una correlación lineal significativa entre

las concentraciones de analito y la señal registrada. En el Anexo 1 se incluye una muestra de este cálculo.

Finalmente, es recomendable examinar visualmente las curvas de calibración y los gráficos de residuales para identificar valores atípicos y confirmar la linealidad. (Eurolab, 2016) De esta manera se observa en la Figura 12 el cumplimiento de este parámetro para todos los niveles de concentración de DRO y ORO.

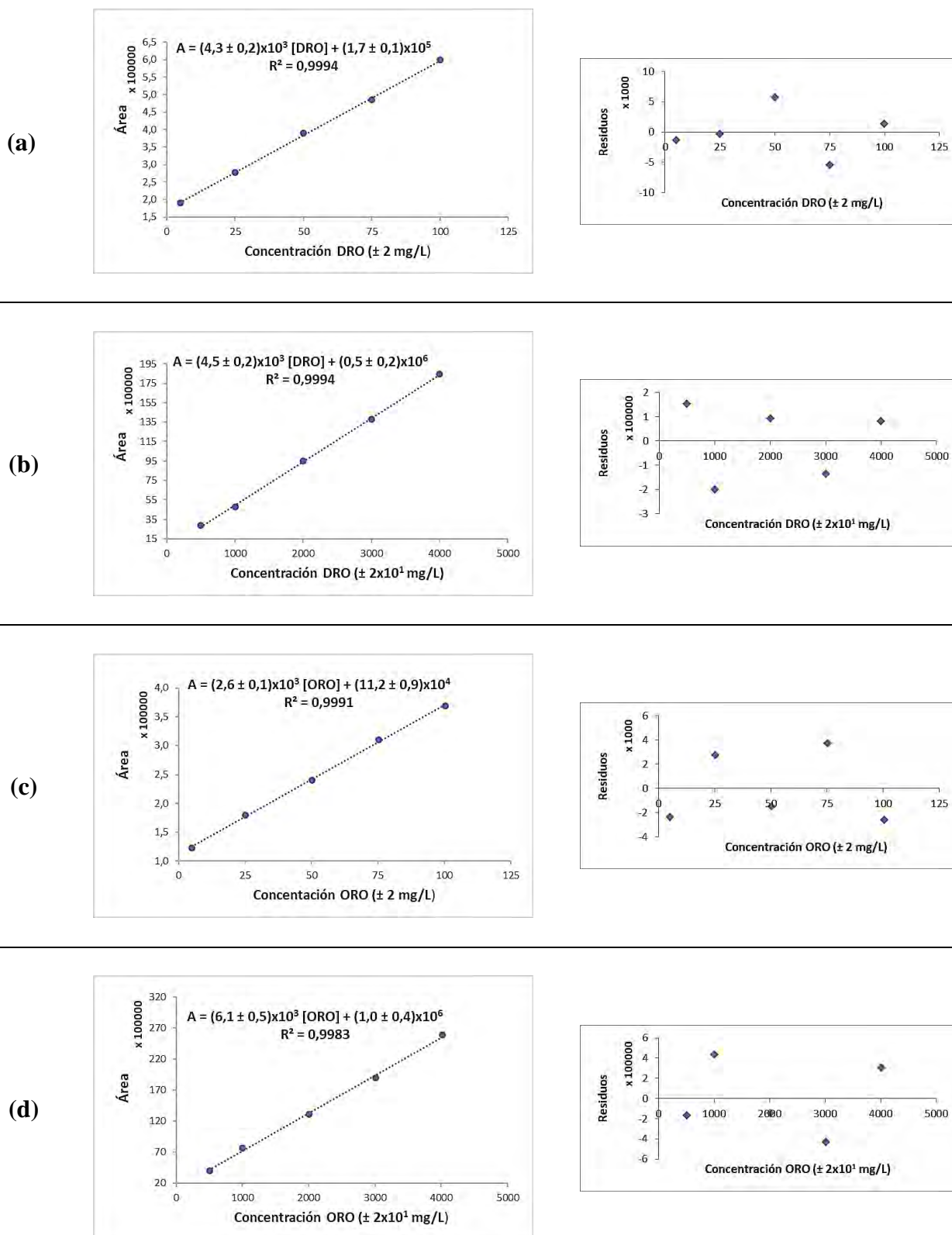


Figura 12. Curvas de calibración y sus respectivos gráficos de residuales para la cuantificación de:
(a) DRO nivel bajo, (b) DRO nivel alto, (c) ORO nivel bajo y (d) ORO nivel alto.

4.2.2 Límite de detección y cuantificación

Para la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se midieron no menos de ocho réplicas de muestra enriquecida con una baja concentración del analito, pero suficiente para que fuera superior al límite de detección esperado, ya que para técnicas cromatográficas se recomienda la detección de picos por encima del ruido instrumental. (Eurolab, 2016)

Los valores de los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la desviación estándar de los resultados (s_0) y las ecuaciones [3] y [4] respectivamente. En el Anexo 2 se presenta una muestra de dichos cálculos. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro VII.

Cuadro VII. Límites de detección y cuantificación obtenidos de acuerdo con la guía Eurachem (Eurolab, 2016) para DRO y ORO en las matrices analizadas.

Matriz	Analito			
	DRO		ORO	
	LD (mg L ⁻¹)	LC (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LC (mg L ⁻¹)
Agua subterránea	0,03	0,1	0,03	0,1
Agua residual	0,03	0,1	0,03	0,09
Suelo	2 ^a	7 ^a	2 ^a	8 ^a

^a Se reporta en mg kg⁻¹.

El *reglamento de vertido y reúso de aguas residuales*, Decreto N°33601 establece para el vertido de hidrocarburos en cuerpos receptores de agua un valor máximo admisible de 10 mg L⁻¹. Con base en esta información y en otros estudios ambientales se buscó que los límites de aplicación del método fueran comparables con la legislación aplicada.

Si bien en Costa Rica los reglamentos no especifican valores máximos admisibles específicos para los hidrocarburos totales de petróleo, es común que los estudios consideren a los compuestos de mayor toxicidad presentes como una referencia. Por ejemplo, podrían establecerse límites de detección y cuantificación que consideren los valores máximos admisibles para el benceno, el tolueno o el benzo-alfa-pireno y de esta manera garantizar la detección de hidrocarburos a niveles muy bajos de concentración.

En esta validación el estudio de los límites se planteó bajo esta premisa, buscando valores inferiores e incluso menores que $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ en aguas y 10 mg L^{-1} en suelos, como lo plantean otros estudios (Weisman, 1998) y la misma legislación. La diferencia notoria de magnitudes se debe principalmente al efecto matriz que es más representativo en suelos, lo que interfiere con la sensibilidad del método y dificulta alcanzar límites de menor magnitud. (Imam *et al.*, 2019)

Con los resultados obtenidos, se puede inferir que los límites de detección y cuantificación para las fracciones de DRO y ORO alcanzan los valores metas planteados y que son funcionales para el propósito de esta investigación.

Finalmente se debe destacar que la propuesta de los límites depende en gran medida de la técnica trabajada y de los objetivos de la investigación y que, si bien es posible considerar valores específicos para determinar límites de detección y cuantificación, plantear un valor fijo para los TPH es un poco ambiguo, al englobar este análisis una gran variedad de compuestos.

4.2.3 Precisión

El parámetro de precisión se trabajó bajo sus componentes de repetibilidad y precisión intermedia, a través de una estimación de la desviación estándar de grupos pequeños de valores correspondientes a diferentes días (muestras por duplicado medidas en el mismo laboratorio por cinco días). Para esto las dos muestras enriquecidas en cada nivel se agruparon por día de medición donde la combinación de las varianzas entre y dentro de grupos representa la variación total. (Eurolab, 2016)

A través de un ANOVA de un factor se pudo obtener de manera independiente la repetibilidad del método y la variación generada por las condiciones de trabajo (tiempo prolongado). Un ejemplo de la estructura de la tabla ANOVA se presenta en el Anexo 3. Dichos análisis ANOVA se caracterizan porque poseen al menos ocho valores, en cuatro diferentes grupos de dos elementos cada uno, con un total de siete grados de libertad. La desviación estándar de la repetibilidad (s_r) y la precisión intermedia (s_I) se determinaron evaluando los datos correspondientes en las ecuaciones [5], [6] y [7].

$$s_r = \sqrt{MS_i} \quad [5]$$

$$s_i = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}} \quad [6]$$

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_i^2} \quad [7]$$

Donde, MS_i y MS_e corresponden al cuadrado medio dentro y entre grupos respectivamente y n corresponde al número de elementos por grupo.

4.2.3.1 Repetibilidad

La componente de repetibilidad describe la dispersión de los resultados cuando las mediciones son realizadas en condiciones similares (mismo analista, mismo equipo y en un periodo corto de tiempo). En el cuadro VIII se presentan las desviaciones estándar relativas para DRO y ORO en los tres niveles de concentración evaluados.

Cuadro VIII. Desviación estándar relativa (% DER) obtenida para DRO y ORO en los tres niveles de concentración estudiados en condiciones de repetibilidad.

Matriz	Desviación Estándar Relativa (<20% DER)					
	DRO			ORO		
	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto
Aguas subterráneas	14	2	6	8	4	4
Aguas residuales	3	8	6	7	3	10
Suelos	6	11	5	13	2	8

4.2.3.2 Precisión intermedia

La componente de precisión intermedia describe la variación de los resultados en condiciones de mayor variabilidad, en este caso en concreto, medidas en un período prolongado de tiempo (cinco días de medición). En el cuadro IX se presentan las desviaciones estándar relativas para DRO y ORO en los tres niveles de concentración evaluados para precisión intermedia.

Cuadro IX. Desviación estándar relativa (% DER) obtenida para DRO y ORO en los tres niveles de concentración estudiados en condiciones de precisión intermedia.

Matriz	Desviación Estándar Relativa (<20% DER)					
	DRO			ORO		
	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto
Aguas subterráneas	16	4	11	12	5	12
Aguas residuales	12	8	13	11	9	13
Suelos	12	13	11	13	12	15

Con los resultados obtenidos se puede notar que la repetibilidad y la precisión intermedia cumplen con el criterio de aceptación establecido por la norma EPA 8000D, donde los % DER deben ser $\leq 20\%$.

4.2.4 Veracidad

Para el estudio de veracidad, que evalúa los errores sistemáticos que pudieran presentarse, se midió la concentración de los analitos en muestras de ensayo enriquecidas y no enriquecidas (con el patrón mixto de DRO y ORO en concentraciones de 50 000 mg L⁻¹ para el nivel alto, 15 000 mg L⁻¹ para el nivel medio y 150 mg L⁻¹ para el nivel bajo) para determinar el porcentaje de recuperación (R') utilizando la ecuación [2].

En el cuadro X se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos para DRO y ORO en cada matriz, donde se verifica que cumplen con el criterio de aceptación planteado por la EPA 8000D que indica porcentajes de recuperación óptimos entre un (70 – 130) %.

Cuadro X. Porcentajes de recuperación obtenidos para DRO y ORO en los tres niveles de concentración estudiados.

Matriz	Porcentajes de recuperación (70-130) %					
	DRO			ORO		
	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto	Nivel Bajo	Nivel Medio	Nivel Alto
Aguas subterráneas	86	93	102	88	97	96
Aguas residuales	112	99	100	91	101	99
Suelos	101	105	104	94	102	97

4.2.5 Sensibilidad

En este estudio se evaluó la sensibilidad de calibración, que hace referencia a la diferencia mínima de concentración que puede generar una señal medible dentro del intervalo de medición. Para esto se calculó la relación entre el cambio de la respuesta analítica por unidad de concentración, es decir, la pendiente de la recta de mejor ajuste.

Como se observa en la Figura 12 el valor de la pendiente para las curvas de nivel bajo y alto de DRO y ORO es mayor que cero en todos los casos y la señal instrumental incrementa con la cantidad de analito, por lo tanto, se puede inferir que el método es sensible dentro del intervalo de trabajo.

Así mismo, como se ilustra en la Figura 13 es posible realizar una comparación visual del cambio de la señal instrumental por el aumento en la concentración para el patrón mixto de DRO y ORO.

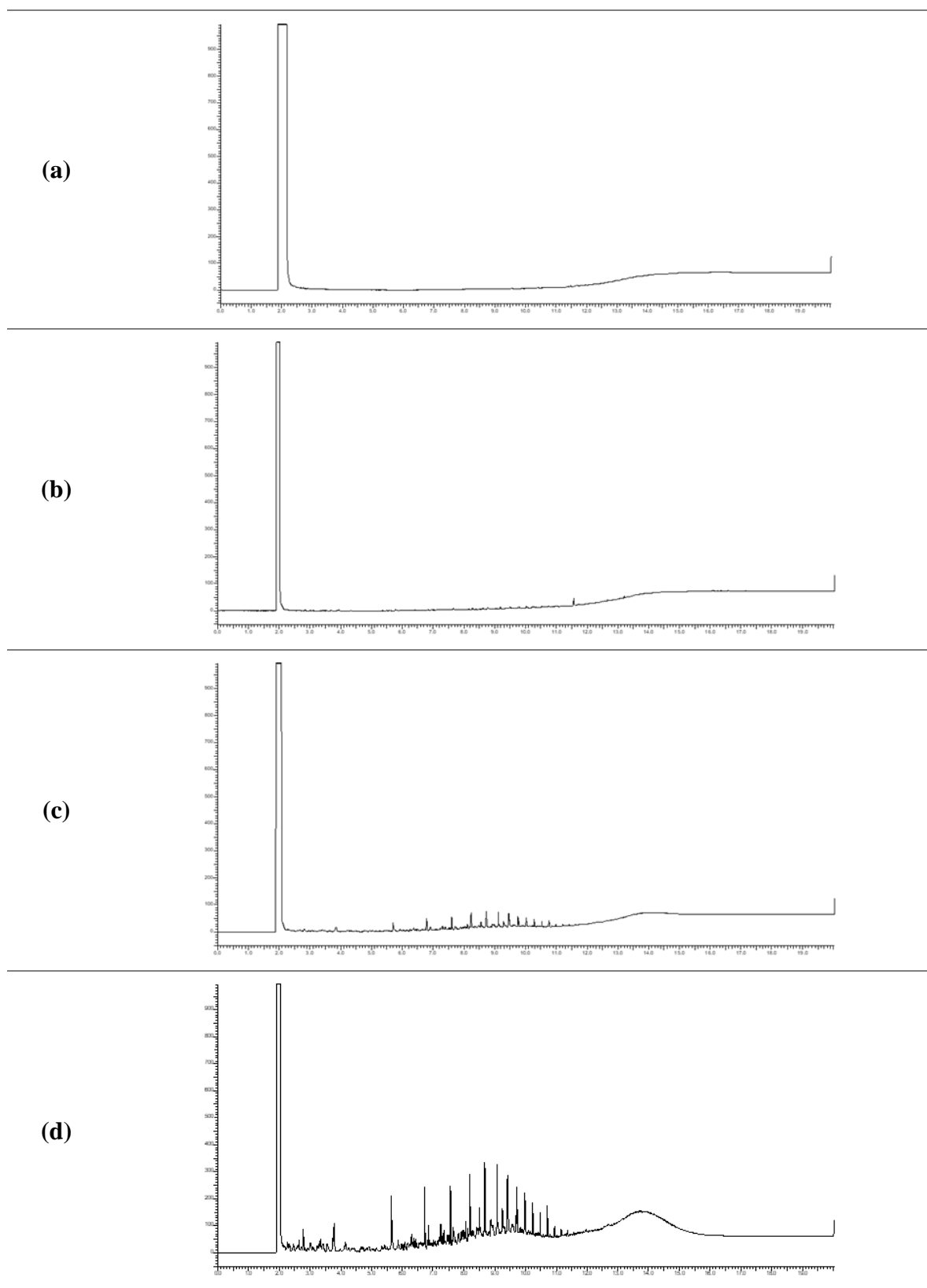


Figura 13. Señales del patrón mixto de DRO y ORO a diferentes concentraciones: (a) Blanco, (b) 100 mg L^{-1} , (c) 500 mg L^{-1} , (d) 4000 mg L^{-1} .

4.2.6 *Selectividad*

Debido a que los TPH son una mezcla compleja y numerosa de hidrocarburos, la norma EPA 8015C define el método de cuantificación de compuestos orgánicos no halogenados como no selectivo. Así mismo, la naturaleza no específica del detector FID y la probable presencia de otros compuestos orgánicos (no categorizados como TPH) hace que estos puedan contribuir en la señal cuantificable de TPH.

Por este motivo, es recomendable que los cromatogramas del método se verifiquen como parte de un control de calidad, sin embargo, el patrón de un cromatograma esperado para un combustible no cambiará significativamente por la presencia de otros hidrocarburos derivados del proceso de degradación, ya que siempre se estará en presencia de otros compuestos que actúan como control dentro de los respectivos rangos de punto de ebullición. De esta manera la figura esperada para un combustible como la gasolina no llegaría a parecerse a la de otro combustible aún en presencia de otros compuestos considerados como interferencias.

De igual manera y considerando el propósito de investigación preliminar de los TPH, la identificación de los compuestos presentes en la mezcla no es un objetivo crítico para la gran mayoría de estas investigaciones.

4.3 Determinación de TPH en muestras ambientales

Una vez realizado el proceso de validación se procedió a aplicar el método en muestras reales ingresadas al Laboratorio Orgánico Medioambiental por medio de muestreos realizados por funcionarios del laboratorio, en el período comprendido entre junio y diciembre del 2020.

Dado que la presente metodología abarca en específico el rango orgánico del diésel (DRO) y el rango orgánico del aceite (ORO) el análisis se realizó particularmente para estas fracciones.

Inicialmente, en el caso de las aguas, se observó que tanto para la fracción de DRO como para la de ORO, la mayoría de las muestras se encontraban en un rango de concentración entre (0 – 100) mg L⁻¹ lo que significa que superaban el límite reglamentario permitido por el *Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales* fijado en 10 mg L⁻¹ para cuerpos receptores, e incluso algunas muestras superaron los 100 mg L⁻¹ y 1000 mg L⁻¹ (ver Figura 14).

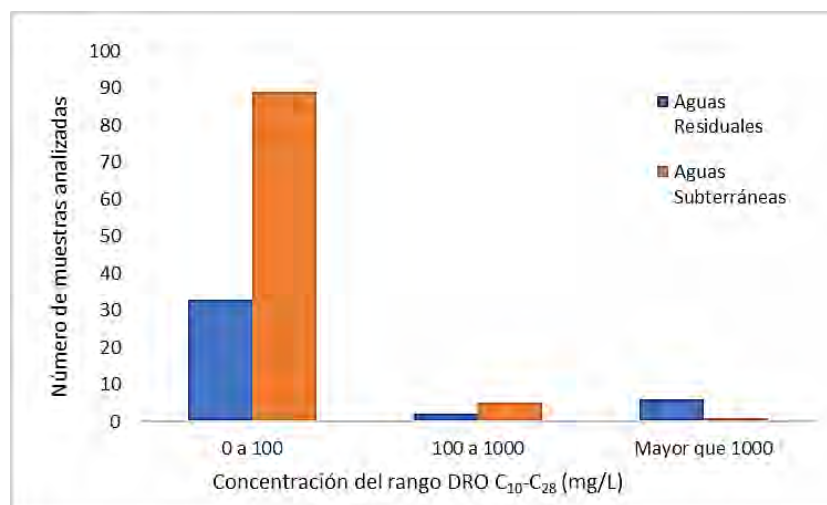


Figura 14. Rangos de concentración obtenidos para DRO en las muestras analizadas de aguas subterráneas y aguas residuales en el período junio – diciembre 2020.

Esta misma tendencia se presentó en el caso de los suelos, Figura 15, donde incluso se puede observar que, en comparación con las matrices de agua, se presentó una mayor cantidad de muestras contaminadas por encima de una concentración de 1000 mg L⁻¹, cuando el límite permitido por el *Reglamento sobre Valores guía en Suelos para Descontaminación de Sitios*

Afectados por Emergencias Ambientales y Derrames establece un valor de intervención de 61 mg L^{-1} para gasolina, diésel y aceite en suelos de uso agrícola y residencial y 100 mg L^{-1} para suelos de uso industrial.

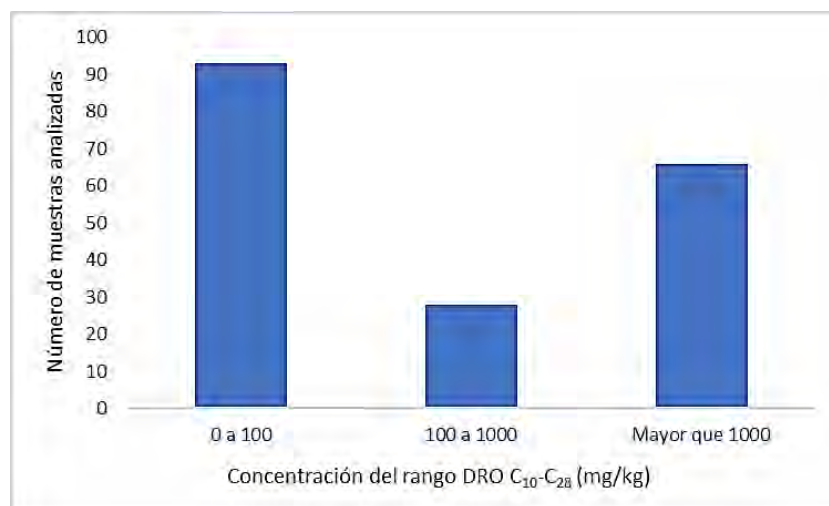


Figura 15. Rangos de concentración obtenidos para DRO en las muestras analizadas de suelos en el período junio – diciembre 2020.

Las Figuras 16 y 17 muestran el comportamiento de la fracción orgánica del aceite (ORO) en aguas y suelos respectivamente. Donde se muestra que la mayoría de las muestras se ubicaron en el rango de $(0 - 100) \text{ mg L}^{-1}$ y que muy pocas superaron los 1000 mg L^{-1} , sin embargo, continúan manteniéndose por encima de los límites establecidos.

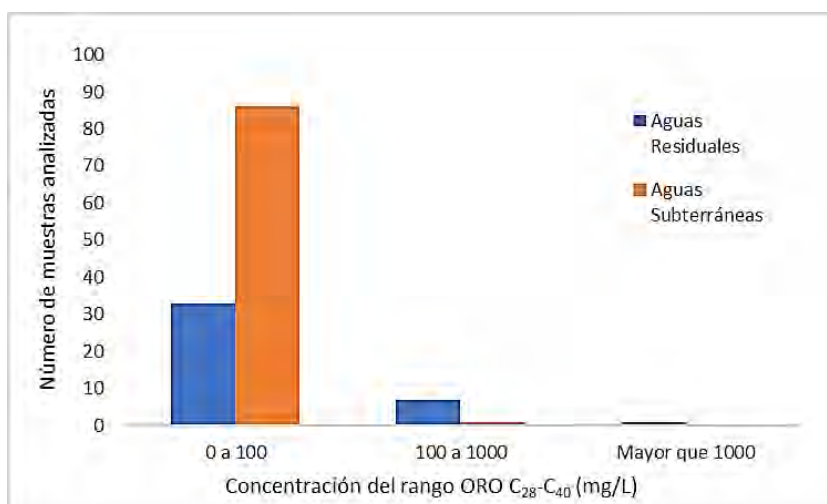


Figura 16. Rangos de concentración obtenidos para ORO en las muestras analizadas de aguas subterráneas y aguas residuales en el período junio – diciembre 2020.

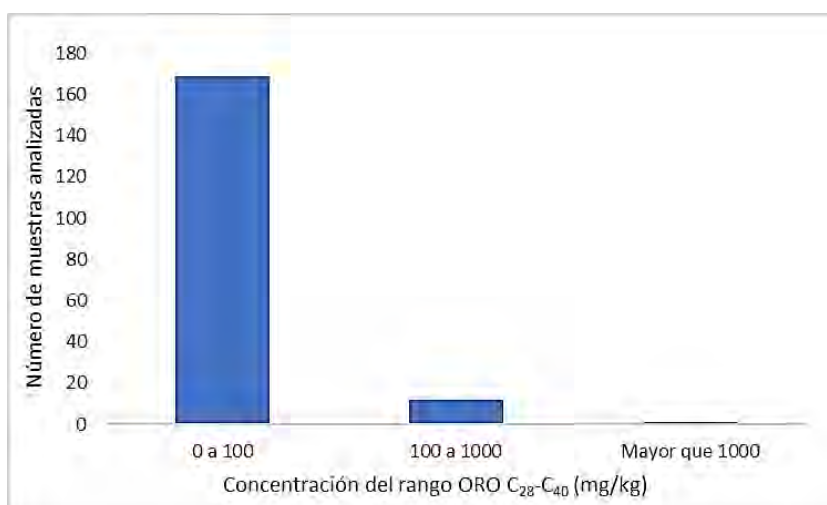


Figura 17. Rangos de concentración obtenidos para ORO en las muestras analizadas de suelos en el período junio – diciembre 2020.

Con dichas fracciones analizadas se procedió a realizar la sumatoria de DRO y ORO para obtener un valor de TPH en algunas de las muestras analizadas de agua subterránea y suelo para este ámbito, con lo que se lograron establecer valores entre (0 – 100) mg L⁻¹ para la mayoría de los análisis, como se muestra en las Figuras 18 y 19 respectivamente.

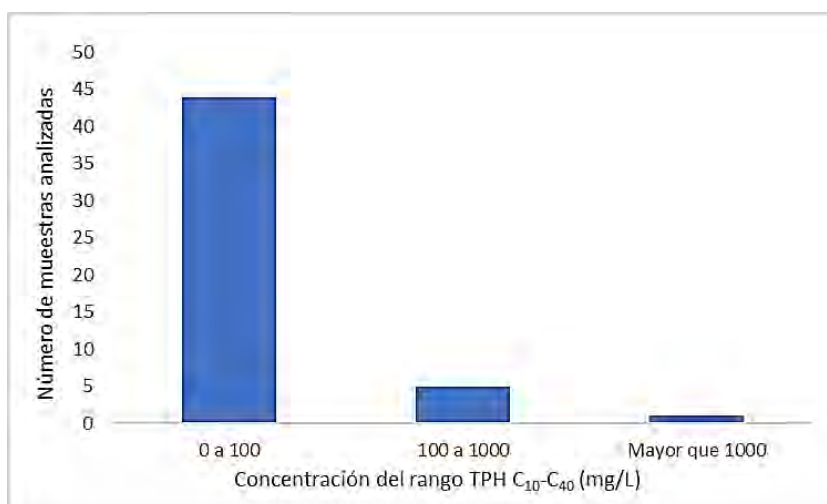


Figura 18. Rangos de concentración obtenidos para la determinación de TPH en algunas muestras analizadas de aguas subterráneas durante el período junio – diciembre 2020.

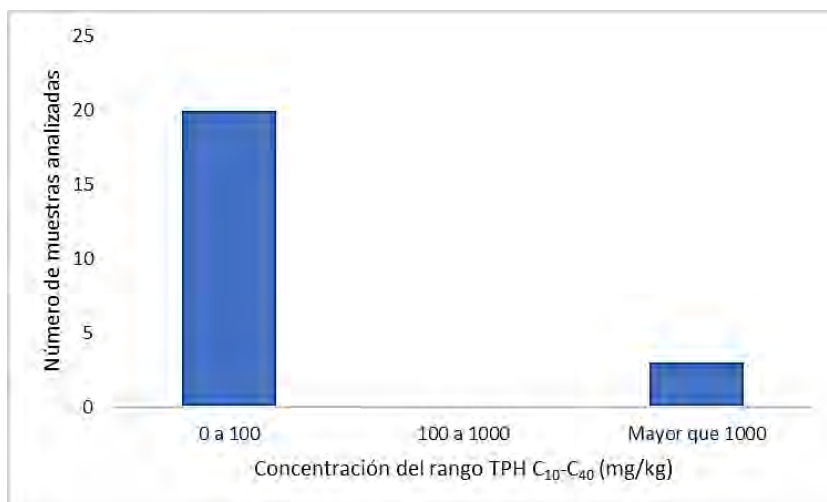


Figura 19. Rangos de concentración obtenidos para la determinación de TPH en algunas muestras analizadas de suelo durante el período junio – diciembre 2020.

Con este estudio se evidenció que la metodología planteada es eficaz para la detección y cuantificación de las fracciones de DRO y ORO en las matrices de aguas y suelos, y que estos dos rangos permiten un estudio preliminar de todo el complejo de TPH.

Además, dicho análisis advierte que la contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo es una situación que no puede ser desatendida a nivel ambiental y que incluso los valores estudiados sobrepasaron los límites reglamentarios, razón por la cual ofrecer este tipo de metodologías posee un valor significativo en el estudio y monitoreo de zonas que presenten riesgo de contaminación o que deban ser intervenidas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en el estudio realizado y los resultados obtenidos se concluye que el método para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en aguas y suelos en las fracciones del rango orgánico del diésel (DRO) de C₁₀ – C₂₈ y el rango orgánico del aceite (ORO) C₂₈ – C₄₀ es adecuado para su uso previsto.

Así mismo, como parte del proceso de validación, se lograron optimizar las condiciones instrumentales que garantizaron el correcto análisis de los parámetros de desempeño. Dichas condiciones se describen en el cuadro XI.

Cuadro XI. Resumen de las condiciones instrumentales definidas en el GC-FID para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo en el rango DRO y ORO.

Condiciones del inyector	
Modo	Split 10:1
Volumen de inyección	2,0 µL
Temperatura inicial	200 °C
Gas de arrastre	Nitrógeno
Flujo de gas	20 mL/min
Condiciones del horno	
Temperatura inicial	60 °C
Programación de temperatura	45 °C/min hasta 380 °C, espera: 9,50 min
Tiempo de corrida	20,61 min
Condiciones del Detector	
Temperatura	380 °C

Con esto se logró también evaluar de manera apropiada cada uno de los parámetros de desempeño planteados, que dieron sustento a la eficacia de la validación. Los resultados obtenidos, junto con su criterio de aceptación para cada matriz, se detallan en los cuadros XII, XIII, XIV.

Cuadro XII. Resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño y su correspondiente criterio de aceptación en la matriz de aguas subterráneas.

Parámetro	Resultado obtenido	Criterio de aceptación	Condición
Linealidad	DRO _(bajo) = 0,996 DRO _(alto) = 0,997 ORO _(bajo) = 0,996 ORO _(alto) = 0,996	$R^2 \geq 0,99$	Cumple
Límite de detección	DRO = 0,03 ORO = 0,03	\leq Límite de reporte legal (mg/L)	Cumple
Límite de cuantificación	DRO = 0,1 ORO = 0,1	\leq Límite de reporte legal (mg/L)	Cumple
Precisión (repetibilidad)	DRO _(bajo) = 14 DRO _(medio) = 2 DRO _(alto) = 6 ORO _(bajo) = 8 ORO _(medio) = 4 ORO _(alto) = 4	$<20\%$ DER	Cumple
Precisión (precisión intermedia)	DRO _(bajo) = 16 DRO _(medio) = 4 DRO _(alto) = 11 ORO _(bajo) = 12 ORO _(medio) = 5 ORO _(alto) = 12	$<20\%$ DER	Cumple
Veracidad	DRO _(bajo) = 86 DRO _(medio) = 93 DRO _(alto) = 102 ORO _(bajo) = 88 ORO _(medio) = 97 ORO _(alto) = 96	(70-130) %	Cumple
Sensibilidad	DRO _(bajo) = $(4,3 \pm 0,2) \times 10^3$ DRO _(alto) = $(4,5 \pm 0,2) \times 10^3$ ORO _(bajo) = $(2,6 \pm 0,1) \times 10^3$ ORO _(alto) = $(6,1 \pm 0,5) \times 10^3$	> 0	Cumple
Selectividad	No aplica	No aplica	No aplica por la naturaleza del método

Cuadro XIII. Resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño y su correspondiente criterio de aceptación en la matriz de aguas residuales.

Parámetro	Resultado obtenido	Criterio de aceptación	Condición
Linealidad	DRO _(bajo) = 0,996 DRO _(alto) = 0,997 ORO _(bajo) = 0,996 ORO _(alto) = 0,996	$R^2 \geq 0,99$	Cumple
Límite de detección	DRO = 0,03 ORO = 0,03	\leq Límite de reporte legal (mg/L)	Cumple
Límite de cuantificación	DRO = 0,1 ORO = 0,09	\leq Límite de reporte legal (mg/L)	Cumple
Precisión (repetibilidad)	DRO _(bajo) = 3 DRO _(medio) = 8 DRO _(alto) = 6 ORO _(bajo) = 7 ORO _(medio) = 3 ORO _(alto) = 10	$<20\%$ DER	Cumple
Precisión (precisión intermedia)	DRO _(bajo) = 12 DRO _(medio) = 8 DRO _(alto) = 13 ORO _(bajo) = 11 ORO _(medio) = 9 ORO _(alto) = 13	$<20\%$ DER	Cumple
Veracidad	DRO _(bajo) = 112 DRO _(medio) = 99 DRO _(alto) = 100 ORO _(bajo) = 91 ORO _(medio) = 101 ORO _(alto) = 99	(70-130) %	Cumple
Sensibilidad	DRO _(bajo) = $(4,3 \pm 0,2) \times 10^3$ DRO _(alto) = $(4,5 \pm 0,2) \times 10^3$ ORO _(bajo) = $(2,6 \pm 0,1) \times 10^3$ ORO _(alto) = $(6,1 \pm 0,5) \times 10^3$	> 0	Cumple
Selectividad	No aplica	No aplica	No aplica por la naturaleza del método

Cuadro XIV. Resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño y su correspondiente criterio de aceptación en la matriz de suelos.

Parámetro	Resultado obtenido	Criterio de aceptación	Condición
Linealidad	DRO _(bajo) = 0,996 DRO _(alto) = 0,997 ORO _(bajo) = 0,996 ORO _(alto) = 0,996	$R^2 \geq 0,99$	Cumple
Límite de detección	DRO = 2 ORO = 2	\leq Límite de reporte legal (mg/L)	Cumple
Límite de cuantificación	DRO = 7 ORO = 8	\leq Límite de reporte legal (mg/L)	Cumple
Precisión (repetibilidad)	DRO _(bajo) = 6 DRO _(medio) = 11 DRO _(alto) = 5 ORO _(bajo) = 13 ORO _(medio) = 2 ORO _(alto) = 8	$< 20\%$ DER	Cumple
Precisión (precisión intermedia)	DRO _(bajo) = 12 DRO _(medio) = 13 DRO _(alto) = 11 ORO _(bajo) = 13 ORO _(medio) = 12 ORO _(alto) = 15	$< 20\%$ DER	Cumple
Veracidad	DRO _(bajo) = 101 DRO _(medio) = 105 DRO _(alto) = 104 ORO _(bajo) = 94 ORO _(medio) = 102 ORO _(alto) = 97	(70-130) %	Cumple
Sensibilidad	DRO _(bajo) = $(4,3 \pm 0,2) \times 10^3$ DRO _(alto) = $(4,5 \pm 0,2) \times 10^3$ ORO _(bajo) = $(2,6 \pm 0,1) \times 10^3$ ORO _(alto) = $(6,1 \pm 0,5) \times 10^3$	> 0	Cumple
Selectividad	No aplica	No aplica	No aplica por la naturaleza del método

Con la metodología también se logró analizar de manera efectiva una cantidad significativa de muestras que puso a prueba el desempeño del método, con lo que se pudo identificar que muchas de estas superaban los límites reglamentarios permitidos, por lo que se concluye que la metodología representa una herramienta de gran utilidad para el estudio y monitoreo de sitios contaminados con hidrocarburos.

La validación del método de hidrocarburos totales de petróleo representó para el laboratorio un reto analítico significativo, no solo por su objetivo de crecimiento en cuanto a la oferta de sus servicios, sino porque la metodología abría espacio a otras investigaciones ambientales para el sector industrial del país y en ese sentido, ampliar en otras líneas de investigación relacionadas o dar pie a la mejora de factores que aún deben optimizarse, resultaría de gran aporte.

Primordialmente se recomienda la validación e implementación del rango orgánico de la gasolina (GRO), que para esta investigación se definió entre C₆ – C₁₀, ya que para completar la totalidad del parámetro de hidrocarburos (TPH) es necesario determinar también el aporte de los compuestos volátiles. Para esto, se recomienda trabajar con el equipo requerido y las técnicas especializadas que faciliten la cuantificación de compuestos volátiles, como por ejemplo la tecnología *headspace*, que permiten una extracción e inyección eficiente de dichas sustancias.

Así mismo, se recomienda incluir de manera más integral, el análisis y cálculo de la incertidumbre de medición, como parámetro complementario a la exactitud de los resultados, siendo especialmente minucioso la incertidumbre asociada a los muestreos, ya que se ha comprobado en algunos estudios geoquímicos que este procedimiento aporta entre un (50 – 70) % de la totalidad de la incertidumbre de la medición. (Saari *et al.*, 2008)

Por otra parte, incluir controles de calidad más rigurosos para monitorear el comportamiento de la calibración, la extracción eficiente de las muestras y la aparición de posibles interferencias es una necesidad imperante para mantener un método competente, por esta razón se recomienda, en la medida de lo posible, incorporar compuestos subrogados al proceso de extracción de muestras, que evalúen con mayor eficacia las posibles interferencias con los analitos y el uso continuo de patrones de marcaje que faciliten la labor de cuantificar a partir de las figuras cromatográficas obtenidas.

Así mismo se recomienda extender el análisis del parámetro de veracidad considerando enriquecimientos por debajo de los 150 mg L^{-1} planteados inicialmente, con la finalidad de garantizar una mayor cobertura del control de las muestras que, como se observó en la medición de muestras ambientales, se encontraban por debajo de los 100 mg L^{-1} .

Por otra parte, y en concordancia con la finalidad de protección ambiental que busca esta investigación, se recomienda el estudio y aplicación de otras sustancias disolventes diferentes al diclorometano, que tengan una eficiencia analítica y cromatográfica igual o superior, pero que posean un menor impacto ambiental como residuo.

Finalmente, es importante resaltar en este tipo de metodología que sus resultados son muy apegados a la técnica de análisis que se utilice, por lo que las comparaciones entre metodologías o parámetros de desempeño deben ser consistentes y evaluados previamente por los laboratorios para obtener resultados reproducibles.

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS

- Abha, S., & Singh, C. S. (2012). Hydrocarbon Pollution: Effects on Living Organisms, Remediation of Contaminated Environments, and Effects of Heavy Metals Co-Contamination on Bioremediation. In *Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites* (pp. 185–206). InTech. www.intechopen.com
- Acuña-González, J; Vargas-Zamora, J; Gómez-Ramírez, E & García-Céspedes, J. (2004). Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. Recuperado de: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000600005
- Arceyut-Morales, Y., & Torres-Alvarado, C. (2019). Planificación de Contingencias para Derrames de Hidrocarburos en Muelles Petroleros de RECOPE.
- Augulyte, L., Kliugaite, D., Racys, V., Jankunaite, D., Zaliauskiene, A., Andersson, P.L., Bergqvist, P.A., 2008. Chemical and ecotoxicological assessment of selected biologically activated sorbents for treating wastewater polluted with petroleum products with special emphasis on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water, Air, Soil Pollut.* 195, 243e256.
- ARESEP. (2020). Intendencia de Energía Informe Calidad del Servicio Combustibles Líquidos y Asfaltos.

- Arjoon, K., & Speight, J. (2020). Chemical and physical analysis of a petroleum hydrocarbon contamination on a soil sample to determine its natural degradation feasibility. *Inventions*, 5(43), 1–10. <https://doi.org/10.3390/inventions5030043>
- ASTDR. (s.f). Overview of total petroleum hydrocarbons. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123-c2.pdf>
- ASTM E2857-11R16. (2016). Standard Guide for Validating Analytical Methods. <https://doi.org/10.1520/E2857-11R16>.
- Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., & Casares, J. J. (2018). Environmental Fate of Petroleum Hydrocarbons in Soil: Review of Multiphase Transport, Mass Transfer, and Natural Attenuation Processes. *Pedosphere*, 28(6), 833–847. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60046-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60046-3)
- Bansal, V., Krishna, G. J., Singh, A. P., Gupta, A. K., & Sarpal, A. S. (2008). Determination of Hydrocarbons Types and Oxygenates in Motor Gasoline: A Comparative Study by Different Analytical Techniques, 05(2), 410–415. <https://doi.org/10.1021/ef0701211>.
- Bekins, B., Brennan, J., Tillitt, D., Cozzarelli, I., Illig, J., & Martinović-Weigelt, D. (2020). Biological Effects of Hydrocarbon Degradation Intermediates: Is the Total Petroleum Hydrocarbon Analytical Method Adequate for Risk Assessment? *Environmental Science and Technology*, 54(18), 11396–11404. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02220>

- Bence, A. E., Page, D. S., & Boehm, P. (2004). Optimizing Detection Limits for the Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Complex Environmental Samples, *38*(14), 3958–3964. <https://doi.org/10.1021/es049896o>.
- Bert, V., Seuntjens, P., Dejonghe, W., Lacherez, S., Thuy, H.T., Vandecasteele, B., (2009). Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *16*, 745e764. <https://doi: 10.1007/s11356-009-0205-6>.
- Bierkens, J., & Geerts, L. (2014). Environmental hazard and risk characterisation of petroleum substances: A guided “walking tour” of petroleum hydrocarbons. *Environment International*, *66*, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.01.030>
- Botello, A., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., & Agraz-Hernández, C. (Eds.). (2005). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias* (2da ed.). Universidad Autónoma de Campeche.
- Briker, Y., & Ring, Z. (2001). Diesel fuel analysis by GC-FIMS: Aromatics, n-paraffins, and isoparaffins. *Energy and Fuels*, *15*(1), 23–37. <https://doi.org/10.1021/ef000106f>
- Canadian Council of Ministers of the Environment. (2008). *Canada-Wide Standard for Petroleum Hydrocarbons (PHC) in Soil: Scientific Rationale*. Canadian Council of Ministers of the Environment.
- Castellanos, M. L., Isaza, R. J., & Torres, J. M. (2015). Avaliação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em solo urbano em Maicao, Colômbia. *Revista Colombiana de Quimica*, *44*(3), 11–17. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55605>

- Collins, C.D., 2007. Implementing phytoremediation of petroleum hydrocarbons. In: Willey, N. (Ed.), *Methods in Biotechnology 23: Phytoremediation: Methods and Reviews*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp. 99e108.
- Decreto N°.37757-S. Sistema Costarricense de Información Jurídica, San José, 11 de julio de 2013.
- Decreto N°. 38924-S. Sistema Costarricense de Información Jurídica, San José, 01 de setiembre de 2015.
- Drozdova, S., Ritter, W., Lendl, B., & Rosenberg, E. (2013). Challenges in the determination of petroleum hydrocarbons in water by gas chromatography (hydrocarbon index). *Fuel*, 113, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.03.058>
- Eurolab. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Eurolab España.
- Gennadiev, A. N., Pikovskii, Y. I., Tsibart, A. S., & Smirnova, M. A. (2015). Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). *Eurasian Soil Science*, 48(10), 1076–1089. <https://doi.org/10.1134/S1064229315100026>
- Grosser, Z., Ryan, J., & Dong, M. (1993). Environmental chromatographic methods and regulations in the United States of America. *Journal of Chromatography*, 642, 75–87.

- Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., & Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.023>
- JCGM. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)*. 3a. ed. Recuperado de: https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web_0.pdf
- Johnson, K. J., Rose-Pehrsson, S. L., & Morris, R. E. (2004). Monitoring diesel fuel degradation by gas chromatography - Mass spectroscopy and chemometric analysis. *Energy and Fuels*, 18(3), 844–850. <https://doi.org/10.1021/ef030161z>
- Kanaujia, P. K. (2018). Gas chromatography | Petroleum and petrochemical applications. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed., pp. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14104-6>
- Liang, S., & Tilotta, D. C. (2003). Determination of total petroleum hydrocarbons in soil by dynamic on-line supercritical fluid extraction with infrared photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 986, 319–325. www.elsevier.com/locate/chroma
- Mora, D., Jimena, A., Gutiérrez, O., Rivera, P., Yuliana, N., Castro, S., Zúñiga, L., David, Z., Bolaños, C., & Campos, A. U. (2018). *Índice de Riesgos de la Calidad del Agua para Consumo Humano en Costa Rica (RCACH)*. (Actualizado el 26/01/2018)

- Nespeca, M. G., Sequinel, R., & de Oliveira, J. E. (2019). Ultra-fast gas chromatographic with flame ionization detector (UFGC-FID) and sonication methods for determination of total petroleum hydrocarbons fractions and BTEX in soil. *Microchemical Journal*, *150*. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104163>
- Okparanma, R. N., & Mouazen, A. M. (2013). Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: A review of spectroscopic and nonspectroscopic techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*, *48*(6), 458–486. <https://doi.org/10.1080/05704928.2012.736048>
- Park, I. S., & Park, J. W. (2010). A novel total petroleum hydrocarbon fractionation strategy for human health risk assessment for petroleum hydrocarbon-contaminated site management. *Journal of Hazardous Materials*, *179*(1–3), 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.124>
- PEN.2019. *Informe Estado de la Nación 2019*. San José: Programa Estado de la Nación.
- PEN. 2018. *Informe Estado de la Nación 2018*. San José: Programa Estado de la Nación.
- Pérez Pavón, J. L., Guerrero Peña, A., García Pinto, C., & Moreno Cordero, B. (2004). Detection of soil pollution by hydrocarbons using headspace-mass spectrometry and identification of compounds by headspace-fast gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1047*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.113>

- Pikovskii, Y. I., Korotkov, L. A., Smirnova, M. A., & Kovach, R. G. (2017). Laboratory analytical methods for the determination of the hydrocarbon status of soils (a review). *Eurasian Soil Science*, *50*(10), 1125–1137. <https://doi.org/10.1134/S1064229317100076>
- Pindado Jiménez, O., Pérez Pastor, R., Escolano Segovia, O., & del Reino Querencia, S. (2015). Exploring petroleum hydrocarbons in groundwater by double solid phase extraction coupled to gas chromatography-flame ionization detector. *Talanta*, *131*, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.042>
- Public Health Service. (1999). *Toxicological Profile for Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)*.
- Riazi, M. (2005). Characterization of Petroleum Fractions. In M. Riazi (Ed.), *Characterization and Properties of Petroleum Fractions* (2nd ed., pp. 87–150). American Society For Testing and Materials. www.astm.org
- RECOPE. (26 de setiembre de 2019). Robo de combustibles: Un problema delincuencia que menoscaba la seguridad nacional. <https://www.recope.go.cr/robo-combustibles-problema-delincuencia-menoscaba-la-seguridad-nacional/>
- RECOPE. (29 de abril de 2019). *Aumenta frecuencia y riesgo en robo de combustibles*. <https://www.recope.go.cr/aumenta-frecuencia-riesgo-robo-combustibles/>
- Rozaimah, S., Abdullah, S., & Al-baldawi, I. A. (2020). Chemosphere Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: Application, mechanisms, challenges and opportunities. *Chemosphere*, *247*, 125932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125932>

- Saari, E., Perämäki, P., & Jalonen, J. (2007). Effect of sample matrix on the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by gas chromatography-flame ionization detection. *Microchemical Journal*, 87(2), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.06.002>
- Saari, E., Perämäki, P., & Jalonen, J. (2008). Measurement uncertainty in the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by GC-FID. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 92(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.11.006>
- Saari, E., Perämäki, P., & Jalonen, J. (2010). Evaluating the impact of GC operating settings on GC-FID performance for total petroleum hydrocarbon (TPH) determination. *Microchemical Journal*, 94(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.09.004>
- Schwab, A. P., Su, J., Wetzels, S., Pekarek, S., & Banks, M. K. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science and Technology*, 33(11), 1940–1945. <https://doi.org/10.1021/es9809758>
- Speight, J. (2015). *Handbook of Petroleum Product Analysis* (M. Vitha, Ed.; 2nd ed., Vol. 182). John Wiley & Sons, Inc.
- Speight, J. G. (2011). Environmental Effects of Hydrocarbons. In *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes* (2nd ed., pp. 539–576). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-8632-7.10015-5>

- The FEM Method Validation Team. (2005). Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis. Recuperado de: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-01/documents/chemmethod_validity_guide.pdf
- Veriotti, T., & Sacks, R. (2000). High-Speed GC / MS of Gasoline-Range Hydrocarbon Compounds Using a Pressure-Tunable Column Ensemble and Time-of-Flight Detection, *72*(14), 3063–3069. <https://doi.org/10.1021/ac000081h>.
- Wade, T. L., Sericano, J. L., Sweet, S. T., Knap, A. H., & Guinasso, N. L. (2016). Spatial and temporal distribution of water column total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and total petroleum hydrocarbons (TPH) from the Deepwater Horizon (Macondo) incident. *Marine Pollution Bulletin*, *103*(1–2), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.002>
- Wang, L., Cheng, Y., Lamb, D., Dharmarajan, R., Chadalavada, S., & Naidu, R. (2019). Application of infrared spectrum for rapid classification of dominant petroleum hydrocarbon fractions for contaminated site assessment. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *207*, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.09.024>
- Wang, Z., & Fingas, M. (1997). Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, *774*, 51–78.
- Weisman, W. (Ed.). (1998). *Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media* (Vol. 1). Amherst Scientific Publishers.

- WHO. (2011). *Guidelines for drinking water*, 4th ed.
- Xie, G., Barcelona, M. J., & Fang, J. (1999). Quantification and interpretation of total petroleum hydrocarbons in sediment samples by a GC/MS method and comparison with EPA 418.1 and a rapid field method. *Analytical Chemistry*, 71(9), 1899–1904. <https://doi.org/10.1021/ac981244t>
- Zamora-Quirós, A. (2017). *Distribución Espacio-Temporal de Hidrocarburos de Petróleo en Sedimentos Costeros y Disueltos y Dispersos en Aguas Frente a Playa Blanca, Punta Morales en Puntarenas de Costa Rica*.
- Zhang, S., Gedalanga, P.B., Mahendra, S., 2017. Advances in bioremediation of 1,4-dioxane-contaminated waters. *J. Environ. Manag.* 204, 765e774.
- Zemo, D. A., O'Reilly, K. T., Mohler, R. E., Tiwary, A. K., Magaw, R. I., & Synowiec, K. A. (2013). Nature and estimated human toxicity of polar metabolite mixtures in groundwater quantified as TPHd/DRO at biodegrading fuel release sites. *Groundwater Monitoring and Remediation*, 33(4), 44–56. <https://doi.org/10.1111/gwmr.12030>
- Zubair, A., Pappoe, M., James, L., & Hawboldt, K. (2015). Development, optimization, validation and application of faster gas chromatography – flame ionization detector method for the analysis of total petroleum hydrocarbons in contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 1425, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.003>

ANEXOS

Anexo 1

Prueba t para verificar correlación lineal significativa

Hipótesis nula (Ho): la correlación entre el área y la concentración de analito es cero.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$t_{\text{tabulado}} \quad t_3 = 3,18 \text{ (P = 0,05)}$$

Curva de calibración	Nivel	t calculado	Relación
DRO	Bajo	$t = \frac{ 0,9996 \dots \sqrt{5-2}}{\sqrt{1-0,9996 \dots^2}} = 69,2$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{tab}}$ Se rechaza la hipótesis nula
	Alto	$t = \frac{ 0,9997 \dots \sqrt{5-2}}{\sqrt{1-0,9997 \dots^2}} = 71,1$	
ORO	Bajo	$t = \frac{ 0,9995 \dots \sqrt{5-2}}{\sqrt{1-0,9995 \dots^2}} = 57,1$	
	Alto	$t = \frac{ 0,9992 \dots \sqrt{5-2}}{\sqrt{1-0,9992 \dots^2}} = 42,3$	

Anexo 2

Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y cuantificación de DRO en aguas residuales

Cuadro A2. Valores de resumen para la concentración de DRO.

Medición	Concentración DRO (mg L ⁻¹)	Concentración promedio DRO (mg L ⁻¹)	Desviación estándar (mg L ⁻¹)
1	0,069	0,087	0,01
2	0,071		
3	0,086		
4	0,085		
5	0,097		
6	0,094		
7	0,092		
8	0,098		
9	0,092		
10	0,088		

Promedio
$$\overline{[\text{DRO}]} = \frac{\sum[\text{DRO}]_i}{n} = \frac{0,8716 \text{ mg L}^{-1}}{10} = 0,08715 \dots \text{ mg L}^{-1}$$

Desviación estándar
$$s_0 = \sqrt{\frac{\sum([\text{DRO}]_i - \overline{[\text{DRO}]})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{0,0008792}{9}} = 0,00988 \dots \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{LD} = 3 \times s_0 = 3 \times 0,00988 \dots \text{ mg L}^{-1} = 0,03 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{LC} = 10 \times s_0 = 10 \times 0,00988 \dots \text{ mg L}^{-1} = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$$

Anexo 3

Determinación de la repetibilidad y precisión intermedia por un análisis de la varianza (ANOVA) de la concentración de DRO en muestras de ensayo de aguas residuales enriquecidas a un nivel bajo

Cuadro A3-1. Valores de masa de DRO recuperadas en las muestras enriquecidas a un nivel bajo agrupadas por día de medición.

Nivel	Réplica	Masa recuperada (mg)				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Bajo	1	0,095	0,093	0,093	0,070	0,086
	2	0,093	0,100	0,093	0,073	0,090
Suma		0,14	0,18	0,19	0,19	0,19
Promedio		0,071	0,088	0,094	0,096	0,093
Varianza		$4,1 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-6}$

Cuadro A3-2. Estructura de la tabla ANOVA de un factor para la determinación de los cuadros medios de los datos agrupados por día de medición.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000822	4	0,000206	29,7	0,00112	5,19
Dentro de los grupos	$3,46 \times 10^{-5}$	5	$6,92 \times 10^{-6}$			
Total	0,000857	9				

$$s_r = \sqrt{MS_i} = \sqrt{6,92 \times 10^{-6}} = 0,003 \text{ mg}$$

$$s_i = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}} = \sqrt{\frac{2,06 \times 10^{-4} - 6,92 \times 10^{-6}}{2}} = 0,01 \text{ mg}$$

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_i^2} = \sqrt{0,003^2 + 0,01^2} = 0,01 \text{ mg}$$

Repetibilidad

$$\%DER = \frac{s_r}{[DRO]} \times 100 = \frac{0,003}{0,088} \times 100 = 3\%$$

Precisión intermedia

$$\%DER = \frac{s_I}{[DRO]} \times 100 = \frac{0,01}{0,088} \times 100 = 12\%$$