

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

“La huella digital de diversos petróleos involucrados en derrames costeros”

Trabajo Final de Graduación presentado como requisito para optar por el grado de  
Licenciatura en Química

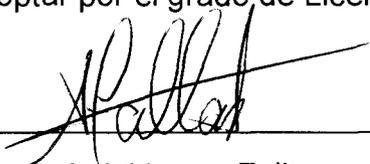
**Adrián Flores Cantillo**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San Pedro, Montes de Oca

2017

El presente Trabajo Final de Graduación ha sido aceptado por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química



Dr. Germán Vidaurre Fallas

Vicedecano de la Facultad de Ciencias

Presidente del Tribunal



M.Sc. Paola Fuentes Schweizer

Directora del proyecto



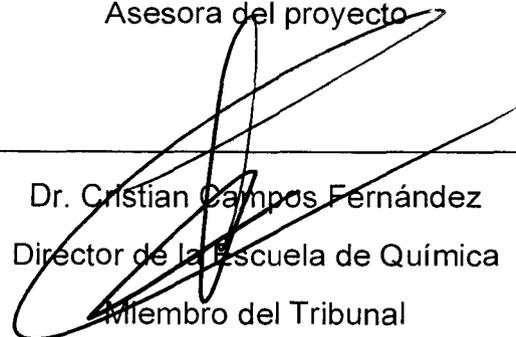
Dra. Ana Lorena Alvarado Gamez

Asesora del proyecto



Lic. María Elena Sibaja García

Asesora del proyecto



Dr. Cristian Campos Fernández

Director de la Escuela de Química

Miembro del Tribunal



B.Q. Adrián Flores Cantillo

Postulante



## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios que me regala todos los días los dones y sabiduría que Él cree necesarios para cumplir mi papel como persona, hijo, amigo y profesional.

A mi profesora tutora, Paola Fuentes Schweizer, no solo por el apoyo y la guía que dio para la formulación, desarrollo y conclusión de este trabajo, sino también por su papel protagónico como profesora, que con su ejemplo motiva a sus estudiantes a ir más allá buscando el desarrollo de nuestro campo profesional.

A mis compañeros Diana, Sol, Kevin, Marcela, Carolina, Karen, Javier y David, y profesores que compartieron conmigo este proceso, quienes brindaron su apoyo, habilidades y conocimiento para que este proyecto se desarrollará con éxito.

A mis papás, por todo el apoyo que siempre me han entregado, por mi superación y por la educación y valores que me han inculcado por los cuales culmino este trabajo.

## Índice general

Agradecimientos .....	iv
Índice general .....	v
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Resumen .....	xii
Capítulo 1: Introducción .....	14
1.1. El agua como recurso. ....	15
1.2. Huella digital de compuestos de petróleo.....	18
1.3. Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.....	21
1.4. Señales cromatográficas obtenidas en el análisis por CG-MS para el cálculo de relaciones de diagnóstico. ....	22
1.5. Legislación europea en cuanto a estudio forense de derrames de petróleo. 24	
1.6. Situación en Costa Rica sobre técnicas para el análisis de huella digital de petróleo y reglamentación. ....	24
1.7. Compuestos de importancia para la determinación de la huella digital del búnker. ....	26
1.8. Validación de la metodología de determinación de huella digital de búnker por CG-MS. ....	28
1.8.1. Linealidad. ....	29
1.8.2. Precisión.....	30
1.8.3. Repetibilidad del método. ....	30
1.9. Justificación. ....	30
1.10. Objetivos del proyecto.....	31
1.10.1. Objetivo primario. ....	31
1.10.2. Objetivos secundarios. ....	31
Capítulo 2: Sección experimental.....	32
2.1. Preparación de muestras. ....	33
2.1.1. Extracción del búnker de muestras acuosas.....	33
2.1.2. Preparación del búnker si este se encuentra puro. ....	35
2.1.3. Purificación del búnker para inyección en sistema de cromatografía. ....	35
2.2. Implementación de método en sistema cromatográfico.....	36
2.2.1. Condiciones instrumentales.....	36

2.2.2.	Método de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM).	38
2.2.3.	Optimización:	39
2.3.	Validación.	40
2.3.1.	Linealidad del equipo.	40
2.3.2.	Precisión.	41
2.3.3.	Repetibilidad método.	42
2.4.	Análisis de datos.	42
2.5.	Verificación de metodología mediante análisis de muestras ciegas.	48
Capítulo 3: Resultados y discusión		50
3.1.	Optimización del método:	51
3.2.	Extracción de la muestra.	52
3.3.	Validación de la metodología.	54
3.3.1.	Validación de la linealidad.	54
3.3.2.	Estimación de la precisión del instrumento, en condiciones de repetibilidad.	57
3.3.3.	Repetibilidad del método.	58
3.4.	Identificación de compuestos y grupos de compuestos según cromatogramas de iones.	60
3.5.	Grupos de interés en la determinación de la huella digital del búnker.	60
3.5.1.	C2- Dibenzotiofenos.	62
3.5.2.	C3-Fenantrenos/Antracenos	62
3.5.3.	C2- Fluorantenos/Pirenos.	63
3.5.4.	C4- Fenantrenos.	63
3.5.5.	C4-Fenantrenos/Antracenos.	65
3.5.6.	C3 Dibenzotiofenos.	65
3.5.7.	C1 Crisenos.	66
3.5.8.	N- Alcanos.	66
3.5.9.	Ion 216.	67
3.5.10.	Ion 123.	67
3.5.11.	Ion 217.	68
3.5.12.	Ion 218.	68
3.5.13.	Ion 231.	69
3.6.	Relaciones de diagnóstico.	69

3.7. Verificación del método.....	74
3.8. Cromatogramas obtenidos para las muestras ciegas preparadas: Comparación visual.....	74
Capítulo 4: Cálculos.....	83
4.1.1. Áreas obtenidas.....	84
4.1.2. Cálculo de relaciones de diagnóstico.....	86
4.1.3. Cálculo de coeficientes de variación para comparar la muestra B con la muestra E.....	88
Capítulo 5: Conclusiones y recomendaciones.....	90
Referencias.....	92
Anexos.....	99
Anexo 1. Datos para la validación de la linealidad, precisión. ....	100
Anexo 2. Manejo de hoja de cálculo elaborada. ....	104
Anexo 3. Hoja de cálculo de la muestra B y E.....	109

## Índice de cuadros

Cuadro I. HPA y biomarcadores comunes en el estudio de huella digital de petróleo. ....	20
Cuadro II. Propiedades del fuel oil según clasificación. ....	27
Cuadro III. Composición típica del búnker. ....	28
Cuadro IV. Parámetros de mérito que generalmente se evalúan al realizar una validación. ....	29
Cuadro V. Parámetros instrumentales utilizados en el método de huella digital implementado. ....	37
Cuadro VI. Grupos de iones de acuerdo a tiempos de retención utilizados para crear el método SIM. ....	39
Cuadro VII. Concentraciones de los estándares preparados para evaluar la linealidad del método. ....	41
Cuadro VIII. Descripción de muestras ciegas. ....	48
Cuadro IX. Porcentajes de acierto para los compuestos utilizados en la optimización del método. ....	51
Cuadro X. Resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del método. ...	55
Cuadro XI. Valores obtenidos para la prueba estadística de linealidad t de student. ....	57
Cuadro XII. Resultados obtenidos en la evaluación de la precisión del método. ...	58
Cuadro XIII. Coeficientes de variación producto del análisis de las relaciones de diagnóstico de duplicados de una muestra de búnker. ....	59
Cuadro XIV. Relaciones de diagnóstico a calcular en la comparación de la huella digital del búnker (los números corresponden a los mostrados en la sección anterior). ....	70
Cuadro XV. Algunas aplicaciones de las relaciones de diagnóstico para los HAP57. ....	72
Cuadro XVI. Áreas obtenidas para la muestra identificada como B. ....	85
Cuadro XVII. Relaciones de diagnóstico para la muestra ciega B. ....	86
Cuadro XVIII. Coeficientes de variación entre las réplicas para las relaciones de diagnóstico de la muestra B. ....	87
Cuadro XIX. Datos del cálculo del coeficiente de variación al comprar la muestra B con la muestra E. ....	89
Cuadro XX. Datos utilizados en el cálculo de la precisión del método. ....	103

## Índice de figuras.

Figura 1. Procesos que se dan cuando el petróleo entra en contacto con el agua. (Fuente: Traducida de National Oceanic and Atmospheric Administration <sup>20</sup> ). ....	17
Figura 2. Esquema a seguir en el análisis de relaciones de diagnóstico. ....	23
Figura 3. Gráfico de importaciones de barriles de hidrocarburos por RECOPE....	25
Figura 4. Equipo utilizado en la extracción del búnker de muestras de agua. ....	34
Figura 5. Equipo utilizado para concentrar las muestras con un flujo de nitrógeno. ....	34
Figura 6. Sistema de elución de muestras de búnker por sulfato de sodio. ....	35
Figura 7. Equipo utilizado en el análisis de huella digital de búnker. ....	37
Figura 8. Primera sección de la hoja de cálculo elaborada. ....	43
Figura 9. Segunda sección de la hoja de cálculo generada.....	44
Figura 10. Tercera sección de la hoja de cálculo elaborada.....	45
Figura 11. Suma de iguales y diferentes en la tercera sección.....	46
Figura 12. Cuarta sección de la hoja de cálculo elaborada. ....	46
Figura 13. Sección quinta de la hoja de cálculo elaborada. ....	47
Figura 14. Parte de hoja de cálculo que indica el estado del cromatógrafo de gases y su respectiva función.....	48
Figura 15. Pasos seguidos para la preparación de las muestras de búnker en el análisis de muestras ciegas. ....	49
Figura 16. Pasos seguidos para la preparación de las muestras de búnker con agua en el análisis de muestras ciegas.....	49
Figura 17. Cromatograma obtenido en la optimización del método bajo las condiciones descritas en el cuadro V, temperatura final horno 300 °C. ....	52
Figura 18. Curva de calibración para el octacosano obtenida por GC-MS. ....	56
Figura 19. Cromatograma de iones obtenido para el ion 212. ....	62
Figura 20. Cromatograma de iones obtenido para el ion 220. ....	62
Figura 21. Cromatograma de iones obtenido para el ion 230. ....	63
Figura 22. Cromatograma de iones para el ion 192. ....	63
Figura 23. Cromatograma de iones obtenido para el ion 198. ....	64
Figura 24. Cromatograma de iones obtenido para el ion 191. ....	64
Figura 25. Cromatograma de iones para el ion 234. ....	65
Figura 26. Cromatograma de iones obtenido para el ion 226. ....	65

Figura 27. Cromatograma de iones obtenido para el ion 242. ....	66
Figura 28. Cromatograma de iones obtenido para el ion 85. ....	66
Figura 29. Cromatograma de iones para el ion 216. ....	67
Figura 30. Cromatograma de iones obtenido para el ion 123. ....	67
Figura 31. Cromatograma de iones obtenido para el ion 217. ....	68
Figura 32. Cromatograma de iones obtenido para el ion 218. ....	68
Figura 33. Cromatograma de iones obtenido para el ion 231. ....	69
Figura 34. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 85. ....	76
Figura 35. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 192. ....	77
Figura 36. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 198. ....	78
Figura 37. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 212. ....	78
Figura 38. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 216. ....	79
Figura 39. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 220. ....	80
Figura 40. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 230. ....	80
Figura 41. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 231. ....	81
Figura 42. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 234. ....	81
Figura 43. Curva de calibración obtenida para el nonadecano por GC-MS. ....	100
Figura 44. Curva de calibración obtenida para el eicosano por CG-MS. ....	100
Figura 45. Curva de calibración obtenida para el heneicosano por CG-MS. ....	101
Figura 46. Curva de calibración obtenida para el tricosano por CG-MS. ....	101
Figura 47. Curva de calibración obtenida para el tetracosano por CG-MS. ....	102
Figura 48. Curva de calibración obtenida para el pentacosano por CG-MS. ....	102
Figura 49. Curva de calibración obtenida para el triacontano por CG-MS. ....	102
Figura 50. Menú de hoja de cálculo en el análisis de los datos obtenidos de los cromatogramas para el método de huella digital. ....	104
Figura 51. Pantalla que se despliega en la pestaña "Ingreso de áreas". ....	105

Figura 52. Pantalla que se despliega en la pestaña " Relaciones de diagnóstico". .....	106
Figura 53. Pantalla que se despliega en la pestaña "Coeficientes de variación".	107
Figura 54. Pantalla que se despliega en la pestaña " Resultados".	108
Figura 55. Pantalla que se despliega en la pestaña "Análisis de equipo".	108
Figura 56. Datos de las áreas de las muestras B y E.	109
Figura 57. Relaciones de diagnóstico entre las réplicas de cada muestra (B y E). .....	110
Figura 58. Conclusión de hoja de cálculo a partir de la comparación de las relaciones de diagnóstico de las muestras B y E.	111
Figura 59. Resultado final de la comparación de las muestras B y E a partir del análisis de los datos.	112

## Resumen

Se realizó la validación e implementación de una metodología por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS), para la obtención y comparación visual y semi-cuantitativa a partir de relaciones de diagnóstico, de la huella digital de muestras de búnker, con el fin de definir si dos muestras pertenecen o no a una misma fuente de combustible.

Se tomó como base para la implementación de la metodología la Norma Europea para la identificación en derrames de petróleo CEN TR 15522-2<sup>1</sup>.

Con esta metodología implementada se compararon muestras de búnker entre sí, por lo tanto, la cuantificación individual de cada uno de los componentes de las muestras no es necesaria; este método se considera como uno de tipo semi cuantitativo. Se tomó en cuenta para la validación los siguientes parámetros de mérito: la linealidad, la precisión del método y del equipo.

En la evaluación de la linealidad se inyectó en el CG-MS tres curvas de calibración de alcanos lineales en tres niveles de concentración (0.5 mg/L – 5 mg/L), se definió como parámetro de aceptación un coeficiente de correlación superior a 0.9850, el cual se obtuvo satisfactoriamente para la mayoría de los casos.

Para el estudio de la precisión del método en condiciones de repetibilidad se inyectó en el sistema de CG-MS un mismo patrón en un total de ocho ocasiones, con el área obtenida para cada compuesto se calculó el coeficiente de variación. Se definió como parámetro de aceptación coeficientes de variación menores al 5%; este valor se obtuvo para todos los casos.

Para el análisis de la repetibilidad se realizó un estudio de duplicados de muestras de búnker, se calculó las relaciones de diagnóstico y se obtuvieron coeficientes de variación entre réplicas menores al 5 %, por lo cual es aceptable la dispersión del método.

Con los datos obtenidos en la validación del método se demuestra que la validación está de acuerdo con el uso previsto del método.

Una vez validado el método se procedió a verificar su eficacia analizando muestras ciegas preparadas en el laboratorio. Se aplicó la metodología de extracción del búnker de muestras acuosas y se inyectó en el sistema de cromatografía de gases. Se logró la identificación de cada una de las muestras al comparar los cromatogramas visualmente y mediante relaciones de diagnóstico los cromatogramas. Con esto se comprueba la efectividad del método en la identificación de diversas muestras al comparar la huella digital de las mismas.

## Capítulo 1: Introducción

## 1.1. El agua como recurso.

El agua es un recurso que se aprovecha en diferentes áreas como lo son el abastecimiento de poblaciones, la generación de energía, actividades de bienes comerciales, entre otros. Si se contamina por alguna causa, se presentan afectaciones tanto para el ambiente como para los consumidores<sup>2-4</sup>. La mayor cantidad de agua se encuentra en nuestros océanos que son utilizados para trasegar diversas materias primas, una de ellas es el petróleo.

La economía mundial depende de la exploración, la producción, el transporte y la refinería de petróleo. Con la alta demanda energética a nivel mundial, los derrames de petróleo en el mar representan un problema de importancia global, estos pueden tener consecuencias negativas para la vida marina, la vida terrestre, afectar negativamente la salud de las personas y romper la sostenibilidad de los recursos marinos<sup>5-7</sup>.

Cerca de un millón de toneladas métricas de petróleo son vertidas en ambientes marinos anualmente de fuentes industriales y municipales, del transporte marino, de filtraciones naturales de petróleo y de derrames accidentales<sup>8</sup>. Aproximadamente 286 000 toneladas de petróleo y sus derivados son usados en Canadá cada día; en Estados Unidos se utiliza cerca de 10 veces esa cantidad y en el mundo cerca de 11 millones de toneladas son utilizados por día<sup>9</sup>.

El transporte de petróleo por vía marina entre las zonas productoras, zonas de procesamiento y las consumidoras, representa una de las principales fuentes de vertidos de petróleo al mar, que pueden ser de tipo accidental o intencional, lo que afecta tanto las zonas costeras como el mar abierto<sup>10</sup>. Los derrames de petróleo son motivo de preocupación por parte de los organismos que se encargan de cuidar la calidad del medio marino, así como de las organizaciones científicas, gubernamentales y no gubernamentales que se interesan en el mejoramiento y en la difusión de la información para el manejo del ambiente<sup>11</sup>.

Un estudio revela que cerca de un billón de litros de petróleo ha sido derramado al mar en Estados Unidos desde 1960, y con la explosión de la

plataforma de petróleo cerca del Golfo de México en el 2010, millones de barriles de petróleo se sumaron a esta cifra (cerca de dos millones de barriles). Estas grandes cantidades de petróleo derramado traen consigo problemas de contaminación, debido a la presencia de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, compuestos polares, compuestos orgánicos volátiles y metales pesados, principalmente en el ambiente marino<sup>12,13</sup>.

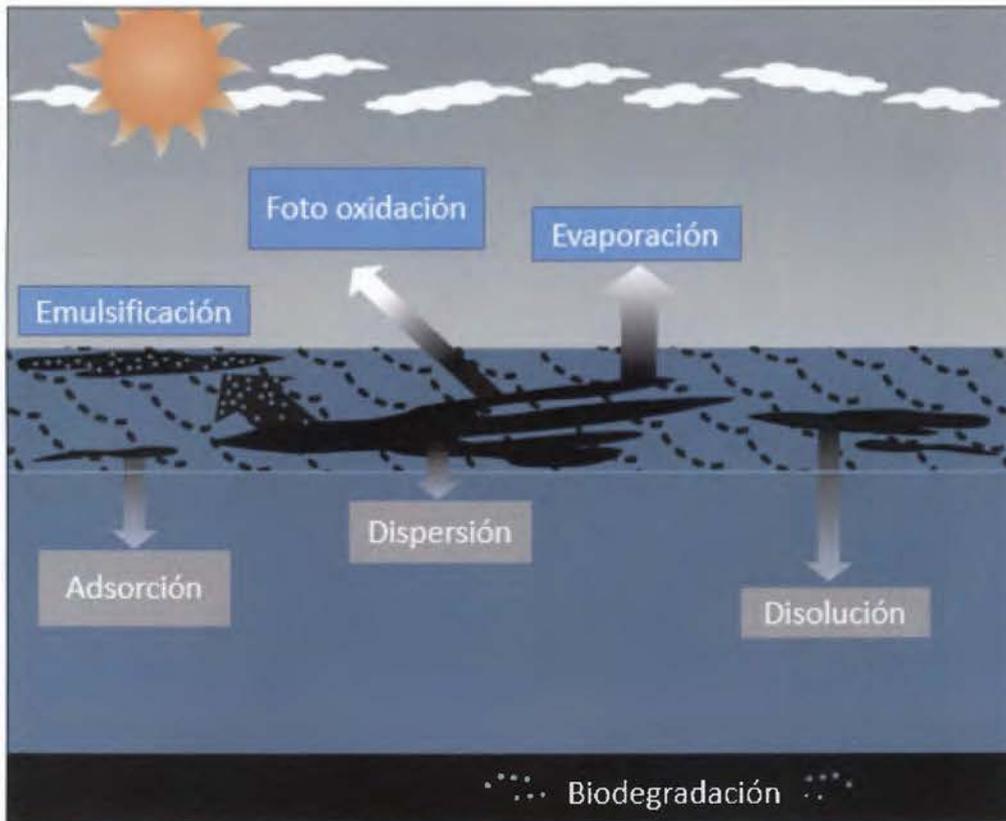
El petróleo vertido afecta a los organismos por contacto directo o por ingestión, tanto de fracciones sólidas como solubles, lo que puede causar efectos a largo plazo. Se ha reportado un alto impacto en especies de plantas, aves y organismos marinos<sup>14</sup>.

Entre las afectaciones que se reportan se incluyen la deformación y la inhibición del crecimiento en embriones de peces después de la exposición al crudo o a sedimentos contaminados de petróleo<sup>12</sup>.

Cuando el petróleo y sus derivados entran en contacto con el agua marina participan de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos, con lo que se modifica su constitución física y química y su distribución en el medio marino, esto se denomina envejecimiento <sup>10,11,15-18</sup>. El proceso de envejecimiento puede ser utilizado para monitorear la ruta y comportamiento del petróleo derramado en el ambiente marino<sup>19</sup>.

Uno de los principales fenómenos del envejecimiento es la formación de emulsiones. Muchas mezclas de petróleo se emulsifican rápidamente en un derrame y representan un reto persistente a la hora de su limpieza y remoción<sup>20</sup>. El proceso que cobra importancia en las primeras etapas del envejecimiento es la evaporación, mientras que la biodegradación juega un papel dominante en las etapas avanzadas<sup>19</sup>.

En la Figura 1 se muestra un diagrama de los diferentes procesos que ocurren en el agua marina cuando hay un derrame de petróleo<sup>11</sup>.



**Figura 1.** Procesos que se dan cuando el petróleo entra en contacto con el agua. (Fuente: Traducida de National Oceanic and Atmospheric Administration<sup>20</sup>).

Cada vertido de petróleo tiene diferentes características; sin embargo, de manera general para un compuesto específico, los procesos físicos ocurren durante las primeras semanas después del derrame; los procesos químicos como la foto oxidación se evidencian al cabo de varias semanas y los procesos biológicos como la biodegradación empiezan a notarse varios meses después<sup>10,21</sup>.

Los vertidos de petróleo al mar han disminuido significativamente en las últimas décadas, gracias a mayores controles y normativas internacionales sobre contaminación de aguas costeras, seguridad marítima y prevención de derrames<sup>10,22</sup>, sin embargo existen malas prácticas en el lavado de tanques y un menor control sobre barcos que no transportan petróleo, de los cuales aún se realizan descargas accidentales e intencionales.

## 1.2. Huella digital de compuestos de petróleo.

En general, todos los yacimientos contienen petróleo con una estructura hidrocarbonada similar, pero las cantidades relativas de sus componentes dependen de su origen, cada crudo de petróleo presenta una huella digital única debido a la variedad de las condiciones geológicas y los años bajo los que fue formado<sup>23,24</sup>. Una manera de conocer el origen de una muestra de petróleo es conocer su huella digital, la química de huella digital representa la concentración relativa de los compuestos presentes en un petróleo analizado, usualmente se obtienen cromatogramas de un complejo análisis que involucra hidrocarburos en un rango de C<sub>2</sub> a C<sub>45</sub>; a partir de las señales cromatográficas obtenidas, se pueden calcular relaciones de diagnóstico que se utilizan para rastrear ese origen<sup>6</sup>.

El estudio químico de la huella digital de derrames de petróleo inició en la década de 1970, seguido de un incremento en la conciencia ambiental de la población y como resultado se establecieron las regulaciones. Actualmente, las técnicas de cromatografía con espectrometría de masas han permitido mejorar el proceso de obtención de huella digital de petróleo<sup>25</sup>.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que existen naturalmente en estado gaseoso, líquido y sólido. Es producto de una gran variedad de materia orgánica que fue químicamente convertida a lo largo del tiempo (cientos de millones de años) bajo diferentes condiciones geológicas y termales<sup>26,27</sup>.

El crudo de petróleo está compuesto principalmente por carbono e hidrógeno (*n*-alcanos, *iso*-alcanos, cicloalcanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados alquilados), además presenta en pequeñas cantidades azufre, oxígeno, nitrógeno (principalmente en compuestos heterocíclicos) y trazas de algunos metales<sup>28</sup>.

Se han realizado diversos estudios sobre la química de la huella digital de los contaminantes de petróleo en ambientes marinos, con el fin de identificar las fuentes del petróleo derramado. Esta huella digital se ha convertido en una herramienta de la ciencia forense, la fuente original de las mezclas químicas complejas se puede

identificar por medio de la abundancia relativa de compuestos que son clave, por ejemplo, los hidrocarburos que formen un patrón químico, o mediante la identificación de compuestos o marcadores específicos característicos de la fuente. La gran variabilidad en la abundancia relativa de estos compuestos entre los diferentes crudos y sus productos refinados, es lo que permite la obtención de la huella digital<sup>29</sup>.

Los marcadores biológicos o biomarcadores son uno de los grupos de hidrocarburos más importantes en la química de huella digital. Son moléculas complejas derivadas de organismos antiguos. Los biomarcadores encontrados en crudos de petróleo, rocas, y sedimentos no presentan cambios estructurales, la concentración de los biomarcadores en los crudos es baja, se encuentran en un rango menor a los 100 mg/kg. Estos biomarcadores pueden ser detectados en concentraciones bajas en presencia de una alta variedad de otros tipos de hidrocarburos con el uso de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas bajo el modo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés)<sup>26</sup>.

Los biomarcadores son utilizados en la química de la huella digital, ya que conservan toda o la mayor parte del esqueleto de carbono original del producto precursor y la similitud estructural revela más información acerca de la fuente del petróleo que otros compuestos presentes<sup>26</sup>, son compuestos más resistentes a los procesos de envejecimiento a corto plazo, debido a su baja reactividad química<sup>11,30-32</sup>.

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) son anillos condensados, constan de dos o más anillos aromáticos fusionados, los naftalenos son los más simples, ya que consisten de dos anillos de benceno. Los HPA son compuestos relativamente estables y mediante las relaciones de diagnóstico proporcionan datos específicos que pueden utilizarse para identificar el origen y el grado de degradación del petróleo derramado<sup>1,33-36</sup>. Estos HPA se consideran los de mayor preocupación a nivel de contaminación ambiental, debido a que representan los componentes de mayor toxicidad en el crudo. Sin embargo, se ha reportado que los efectos tóxicos

en un derrame de petróleo no pueden vincularse solo a los HPA, sino también a otros componentes capaces de penetrar en el medio acuático<sup>12,37</sup>.

Debido al envejecimiento, la identificación de la fuente de petróleo derramado se complica con el transcurso del tiempo. Con el estudio de la huella digital es posible monitorear los cambios en la composición del petróleo derramado y estimar la importancia de los procesos de envejecimiento<sup>29,30,33</sup>.

Entre los principales grupos de HPA y biomarcadores que se emplean en el estudio de huella digital del petróleo y de sus productos refinados se encuentran los mencionados en el Cuadro I.

**Cuadro I.** HPA y biomarcadores comunes en el estudio de huella digital de petróleo.

Compuestos	Estructura	Compuestos	Estructura
Decalina		Benzotiofeno	
C1- Decalinas		C1- Benzotiofenos	
C2- Decalinas		C2- Benzotiofenos	
C3- Decalinas		C3- Benzotiofenos	
C4- Decalinas		C4- Benzotiofenos	
Naftaleno		Dibenzotiofeno	
C1- Naftalenos		C1- Dibenzotiofenos	
C2- Naftalenos		C2- Dibenzotiofenos	
C3- Naftalenos		C3- Dibenzotiofenos	
C4- Naftalenos		C4- Dibenzotiofenos	
Fluoreno		Bifenilo	
C1- Fluorenos			
C2- Fluorenos			
C3- Fluorenos			
Antraceno		Fenantreno	
Dibenzofurano		Fluoranteno	
Pireno		Reteno	

### **1.3. Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.**

Entre los métodos que existen para determinar e identificar sustancias como las del Cuadro I, se encuentran la cromatografía de gases, métodos de partición gravimétrica y métodos espectroscópicos de infrarrojo y ultravioleta<sup>3</sup>.

La cromatografía de gases es una técnica que permite la separación de mezclas complejas de compuestos. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura. Es aquí donde la fusión de ambas técnicas muestra su ventaja en la identificación de compuestos en mezclas complejas.

Por lo tanto, una de las opciones de cromatografía de gases más avanzadas es la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS), la cual puede brindar una caracterización del contenido y distribución de los componentes principales del petróleo, tiene un alto nivel de resolución, una mayor sensibilidad y representa en la actualidad, la principal forma de determinar la huella digital en muestras de petróleo, a partir de la separación e identificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA) y los compuestos biomarcadores <sup>3,28,30,38,39</sup>.

Una de las técnicas de CG-MS que se utiliza para trabajar con mezclas complejas como el petróleo, es la técnica selectiva de monitoreo de iones (SIM por sus siglas en inglés), en la cual el espectrómetro de masas aísla iones específicos de interés en intervalos de tiempo determinados, con lo que se logra aumentar la sensibilidad del detector al disminuir la cantidad de iones que llegan al mismo, obteniendo señales cromatográficas con una menor cantidad de ruido<sup>40</sup>.

#### **1.4. Señales cromatográficas obtenidas en el análisis por CG-MS para el cálculo de relaciones de diagnóstico.**

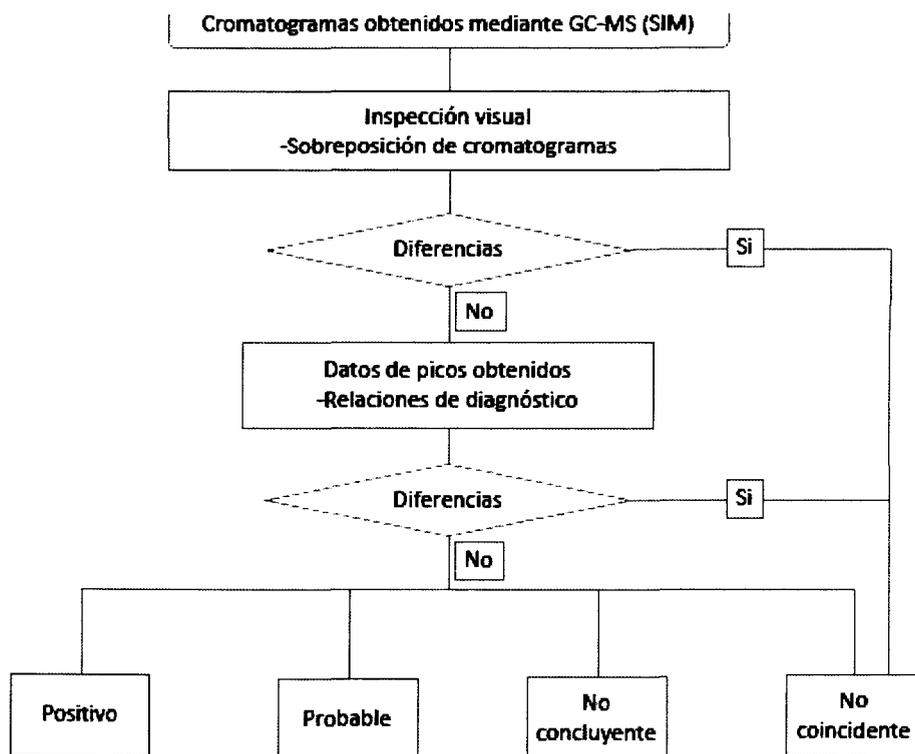
Los datos analíticos obtenidos mediante la CG-MS se pueden utilizar para la comparación de la composición química de diferentes muestras de petróleo al generar un conjunto de relaciones de diagnóstico que se basan en los HPA, en los biomarcadores, o en razones entre ambos. Efectuar un análisis quimiométrico es útil para mejorar el proceso de identificación<sup>30,33,41</sup>.

La relación de diagnóstico se define como la razón entre las alturas o áreas de las señales cromatográficas de los compuestos aislados o grupos de compuestos, seleccionados por su diversidad en la composición química del petróleo y sus derivados. El término se origina de la geoquímica y se relaciona con la diversidad en la composición química de los crudos de petróleo de diferentes provincias geológicas, campos de petróleo, pozos o depósitos individuales<sup>1</sup>.

Si dos muestras de petróleo o productos refinados son iguales, su composición química es la misma por definición. Por lo tanto, las relaciones de diagnóstico para dos muestras idénticas de petróleo no deberían mostrar diferencias significativas a un nivel de confianza establecido.

Se han estudiado diferentes relaciones de diagnóstico entre compuestos individuales y grupos de compuestos, estas son las que se utilizan para comparar las muestras de petróleo o productos refinados. Entre ellos se pueden mencionar las relaciones entre biomarcadores que normalmente proporcionan un alto grado de especificidad entre los diferentes petróleos crudos. Las relaciones basadas en HPA pueden ser importantes en productos refinados en los que su distribución puede ser afectada por procesos de refinería.

En la siguiente Figura 2 se muestra un esquema de la manera correcta de analizar si dos muestras son iguales o no, comparando la huella digital de las mismas mediante relaciones de diagnóstico.



**Figura 2.** Esquema a seguir en el análisis de relaciones de diagnóstico.  
(Elaboración propia).

Se obtiene un resultado positivo cuando la diferencia en los cromatogramas y las relaciones de diagnóstico de las muestras que se comparan son más bajas que la variabilidad del método, o que estas diferencias se puedan explicar sin equivocación, por ejemplo, por envejecimiento.

Un resultado probable se da cuando las diferencias entre los cromatogramas y las relaciones de diagnóstico no permiten asegurar un resultado positivo sin equivocarse, pero puede explicarse la diferencia por factores externos razonablemente, por ejemplo, envejecimiento con mezclas de carácter heterogéneo, o no representativas.

Un resultado es no concluyente cuando las diferencias entre los cromatogramas y las relaciones de diagnóstico no permiten dar una conclusión

positiva o probable, por ejemplo, cuando la concentración de la contaminación es muy pequeña.

Se obtiene un resultado no coincidente cuando las diferencias entre los cromatogramas y las relaciones de diagnóstico de las muestras comparadas son distintas y la variabilidad no se puede explicar por factores como el envejecimiento, la contaminación y/o la heterogeneidad.

### **1.5. Legislación europea en cuanto a estudio forense de derrames de petróleo.**

La metodología europea CEN/TR 15522-2 es un ensayo forense que permite caracterizar e identificar una fuente de petróleo resultante de un derrame accidental o una descarga intencional, ya sea en aguas marinas, estuarios y otros ambientes acuáticos; mediante la comparación de muestras de vertidos con las fuentes sospechosas utilizando la técnica de CG-MS. La norma provee el procedimiento analítico y las especificaciones para el procesamiento de los datos para identificar petróleos derramados y correlacionarlos con las fuentes sospechosas. En el caso de que no se tengan a disposición las fuentes sospechosas, la metodología permite caracterizar al petróleo derramado. El protocolo a aplicar se encuentra restringido a que el petróleo contenga una proporción significativa de hidrocarburos con un punto de ebullición arriba de los 200 °C<sup>1</sup>.

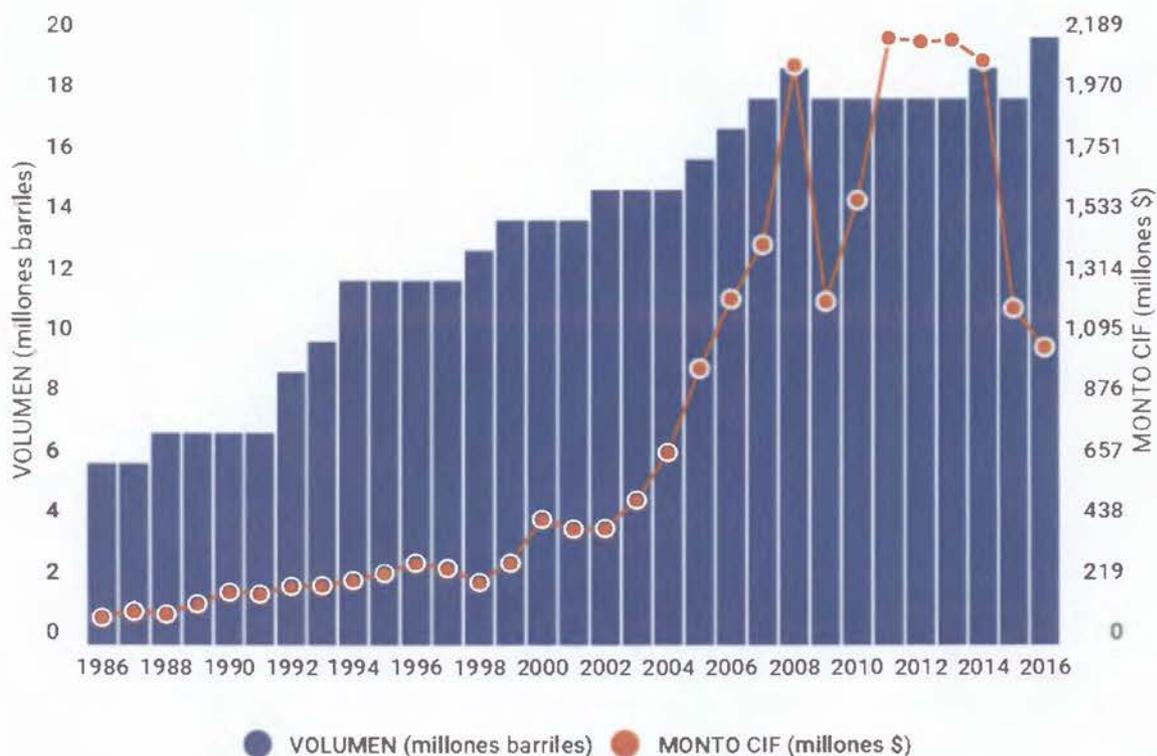
El Comité Europeo de Normalización (CEN) adoptó la CG-MS como técnica analítica estándar en sus protocolos de huellas digitales<sup>29,30,33,42</sup>.

### **1.6. Situación en Costa Rica sobre técnicas para el análisis de huella digital de petróleo y reglamentación.**

En Costa Rica no se ha implementado una metodología con la técnica de CG-MS para obtener la huella digital del petróleo, esta permitiría identificar los vertidos que se realicen intencional y accidentalmente en la zona costera. Además

de que no existe una metodología que permita extender el alcance al uso en búnker (producto de petróleo), que representa un producto de mayor atractivo para el país.

Datos estadísticos de la Refinería Costarricense de Petróleo (RECOPE) indican que al país se importaron alrededor de 20 millones de barriles de hidrocarburos en el año 2016, en el gráfico que se muestra en la Figura 3 se observa la tendencia al alza de las importaciones desde 1986.



**Figura 3.** Gráfico de importaciones de barriles de hidrocarburos por RECOPE.

(Fuente: RECOPE<sup>43</sup>)

En el decreto N° 37176-Minae se establece la preocupación por la contaminación de las aguas, pero el alcance de este documento no contempla los derrames de productos derivados de petróleo al mar. Este decreto establece que

quien contamina el recurso hídrico debe pagar y establece un canon ambiental que es un instrumento económico de regulación<sup>44</sup>.

En este decreto se menciona, basándose en normativa de carácter internacional lo siguiente: “los actuales niveles de contaminación de los cuerpos de agua sobrepasan o amenazan con sobrepasar los límites máximos tolerables para el abastecimiento humano, para el riego y para la sobrevivencia de los ecosistemas naturales”, con esto concluyen que los mecanismos con los cuales se regulan los vertidos y por lo tanto, la contaminación del agua, son ineficaces e insuficientes<sup>44</sup>.

### **1.7. Compuestos de importancia para la determinación de la huella digital del búnker.**

El búnker es parte de los derivados del petróleo que se conocen como “fuel oil”, se utiliza principalmente como combustible en motores de navíos<sup>45</sup>. El fuel oil representa una fracción de la destilación del petróleo, conformada por hidrocarburos de cadenas largas, ciclo alcanos y algunos compuestos aromáticos; entre sus principales características se encuentra que tienen un color oscuro y olor característico a azufre. Se clasifica con los números del 1 al 6 considerando su punto de ebullición, su composición y su viscosidad.

En el Cuadro II se pueden observar las temperaturas de destilación y las viscosidades cinemáticas de cada uno de los seis tipos de fuel oil.

**Cuadro II.** Propiedades del fuel oil según clasificación.

<b>Propiedad</b>	<b>N° 1</b>	<b>N° 2</b>	<b>N° 3</b>	<b>N° 4</b>	<b>N° 5</b>	<b>N° 6</b>
Temperatura de destilación para obtener un 90 % de recuperación (°C)	288	338	343	--	--	--
Viscosidad cinemática máxima a 40 °C (mm <sup>2</sup> /s)	2.4	4.1	4.1	5.5	--	--
Viscosidad cinemática máxima a 100 °C (mm <sup>2</sup> /s)	--	--	--	--	14.9	50

Fuente: ASTM D396-15 c: Standard Specification for Fuel Oils<sup>46</sup>.

De acuerdo a su clasificación se utiliza en diferentes aplicaciones. El N° 1, el N° 2 y el N° 3 son combustibles que se utilizan a nivel doméstico y en hornos industriales pequeños. El N° 4 representa un destilado de una fracción más pesada y se utiliza en hornos comerciales e industriales que operan en un amplio rango de viscosidades. El N° 5 y el N° 6 son combustibles residuales con una alta viscosidad y ámbito de ebullición, su utilización se da principalmente en hornos industriales; dentro de las características principales se encuentra el calentamiento previo para su adecuada manipulación<sup>46</sup>.

El búnker se clasifica como un fuel oil N° 6. Es un combustible que se obtiene como residuo de los procesos de destilación y refinación de los hidrocarburos y dentro de sus principales características se encuentra su alta viscosidad y su alto contenido energético. Su uso mayoritariamente se debe a su bajo costo y se utiliza como combustible en navíos, en la generación eléctrica, en calderas y en hornos<sup>47,48</sup>. En el Cuadro III se muestra la composición de un fuel oil como el búnker.

**Cuadro III. Composición típica del búnker.**

<b>Compuestos</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Saturados	20 a 40
Ceras	5 a 15
Oleofinas aromáticas	30 a 50
HPA	1 a 5
Polares	10 a 20
Asfaltenos	5 a 20
Azufrados	2 a 4
Metales (mg/kg)	100 a 2000

**1.8. Validación de la metodología de determinación de huella digital de búnker por CG-MS.**

La validación según la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2005 es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto<sup>49</sup>. La validación es el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones para las cuales se requieren<sup>50</sup>.

La validación de metodologías es de suma importancia a nivel internacional debido que, al utilizar métodos validados, se cuenta con evidencia suficiente para garantizar que el resultado emitido, al utilizar dicho ensayo, es confiable. Estas metodologías analíticas se suelen emplear en diferentes ramas, desde el control de calidad de productos en general hasta técnicas forenses, entre otras áreas.

La EURACHEM es una organización europea que tiene como uno de sus objetivos la promoción de las buenas prácticas de calidad<sup>51</sup>. Dentro de sus documentos cuenta con una guía para la validación de metodologías.

Para la presentación de evidencias objetivas es necesario evaluar ciertos parámetros de mérito dependiendo del tipo de método que se esté validando. En

el Cuadro IV se muestran los parámetros de mérito que se evalúan generalmente en una validación de acuerdo con la guía de la EURACHEM<sup>50</sup>.

**Cuadro IV.** Parámetros de mérito que generalmente se evalúan al realizar una validación.

<b>Parámetros de mérito</b>	Selectividad
	Límite de detección y límite de cuantificación
	Intervalo de trabajo incluyendo linealidad
	Sensibilidad analítica
	Veracidad
	Precisión
	Robustez

Fuente: Información tomada de "La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados" de la EURACHEM<sup>50</sup>.

La metodología que se va a aplicar representa una de carácter semi cuantitativo por lo que las variables a evaluar no son todas las indicadas en la guía del EURACHEM. Entre los parámetros de mérito a evaluar en esta validación se encuentran: la linealidad, la precisión y la repetibilidad del método; estos parámetros de acuerdo a la metodología CEN/TR 15522-2<sup>1</sup>.

### 1.8.1. Linealidad.

La linealidad define la habilidad de un método para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito<sup>52</sup>.

### **1.8.2. Precisión.**

La precisión se va a evaluar en condiciones de repetibilidad. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, lo cual incluye: un mismo analista, mismos instrumentos y reactivos, en un mismo laboratorio y en un lapso de tiempo corto<sup>52</sup>.

### **1.8.3. Repetibilidad del método.**

Con el fin de comprobar si una diferencia en los valores medidos es significativa o no, se necesita conocer la repetibilidad en inyección del equipo. El laboratorio para el caso del método en cuestión debe ser capaz de garantizar coeficientes de variación menores al 5% para todas las relaciones de diagnóstico<sup>1</sup>.

## **1.9. Justificación.**

Por todo lo expuesto anteriormente es importante prestarle atención al desarrollo de metodologías para un mejor control de derrames de petróleo o productos derivados de petróleo, ya que cabe destacar que la mayoría de derrames al mar se dan en el proceso de descarga de los barcos a la base en tierra y no por derrames accidentales<sup>9</sup>.

El desarrollo de técnicas forenses en el área de hidrocarburos es de suma importancia en la protección del ambiente, debido a la alarmante cantidad de petróleo que se utiliza mundialmente. De aquí la importancia de que Costa Rica desarrolle e implemente metodologías analíticas que permitan tener un control estricto en cuanto a la contaminación de los medios acuáticos por derrames de petróleo.

Guiado por las tendencias internacionales en cuanto a metodologías analíticas es que el país debe de brindar una solución a esta problemática, por lo

tanto, basándose en las regulaciones normadas europeas es que se implementó y adaptó la normativa CEN/TR 15522-2 para dicho fin.

## **1.10. Objetivos del proyecto.**

### **1.10.1. Objetivo primario.**

- Desarrollar un método por cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas para la obtención de la huella digital de muestras de búnker.

### **1.10.2. Objetivos secundarios.**

- Implementar el método de cromatografía de gases acoplada a masas basándose en la norma CEN/TR 15522-2.
- Validar en el Centro de Electroquímica y Energía Química (CELEQ) el método indicado, siguiendo los criterios de la guía Eurachem.
- Diseñar y probar una hoja de cálculo, que facilite el análisis de los datos obtenidos.
- Comparar la huella digital de distintas muestras de petróleo.

## Capítulo 2: Sección experimental

La sección experimental contiene dos partes principales: la extracción del búnker de las muestras de agua y el análisis de las mismas para la obtención de la huella digital por CG-MS. Las muestras de búnker utilizadas fueron suministradas por el Centro de Electroquímica y Energía Química (CELEQ) de la Universidad de Costa Rica.

## **2.1. Preparación de muestras.**

El método se utiliza para comparar la huella digital de muestras de búnker entre sí. Si se requiere comparar la huella digital de una muestra en un derrame costero con una posible fuente de contaminación, se debe extraer del agua el búnker derramado y se debe preparar las posibles fuentes de contaminación para su posterior análisis y comparación. En las siguientes secciones se explica el procedimiento que se siguió dependiendo del caso.

### **2.1.1. Extracción del búnker de muestras acuosas.**

Para realizar la separación del búnker de las muestras acuosas se utilizó la técnica de extracción líquido-líquido, se realizó con tres adiciones sucesivas de 20 mL de disolvente (diclorometano). Una vez separado, se secó el extracto de diclorometano con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para esto se empacó con sulfato de sodio una pipeta Pasteur, que sirve de soporte para el desecante, y se concentró utilizando un rotavapor inicialmente, seguido de un flujo de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 500  $\mu\text{L}$ . El sistema de extracción y de evaporación con corriente de nitrógeno que se utilizó se muestran en la Figura 4 y la Figura 5 respectivamente.



**Figura 4.** Equipo utilizado en la extracción del búnker de muestras de agua.



**Figura 5.** Equipo utilizado para concentrar las muestras con un flujo de nitrógeno.

### 2.1.2. Preparación del búnker si este se encuentra puro.

Para las posibles fuentes de contaminación del agua, la extracción de los componentes importantes en el estudio de huella digital del búnker se realizó disolviendo una masa entre 125 mg y 150 mg de muestra en 1.00 mL de diclorometano. Se eluyó la muestra disuelta a través de una columna de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  utilizando 4 mL de hexano. En la Figura 6 se muestra el sistema utilizado para eluir las muestras por el sulfato de sodio. Se concentró utilizando un flujo de nitrógeno hasta un volumen de aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ .



**Figura 6.** Sistema de elución de muestras de búnker por sulfato de sodio.

### 2.1.3. Purificación del búnker para inyección en sistema de cromatografía.

Una vez que se realiza la extracción del búnker del agua y se prepara muestras de las posibles fuentes del derrame se sigue un mismo procedimiento. En ambos casos es necesario eluir la muestra por una columna de alúmina para

cromatografía marca Brockman Activity II, previamente desactivada, con el fin de eliminar impurezas no volátiles que influyen en el rendimiento de la inyección, la columna y el detector.

Para desactivar la alúmina se adicionó agua ultra pura de un sistema TKA, se mezcló en un vórtex y se dejó secar durante una hora. Con la desactivación, lo que se busca es que sea menos higroscópica, dependiendo del porcentaje en peso de agua añadida así va a ser el grado de desactivación<sup>53</sup>.

Se empacó una columna como la que se muestra en la Figura 6 y se eluyó un total de 25  $\mu$ L de muestra con 7 mL de hexano. Se recolectó el eluato en un vial y se procedió a la separación de la muestra por CG-MS.

## **2.2. Implementación de método en sistema cromatográfico.**

### **2.2.1. Condiciones instrumentales.**

Se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent modelo 7890A. El equipo se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Equipo utilizado en el análisis de huella digital de búnker.

La columna cromatográfica utilizada fue una HP-5-MS (95 % metilpolisiloxano y 5% fenil) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro externo y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria.

Las condiciones iniciales utilizadas en la implementación y la optimización del método se muestran en el Cuadro V.

**Cuadro V.** Parámetros instrumentales utilizados en el método de huella digital implementado.

<b>Parámetro</b>	<b>Condición</b>
<b>Gas de arrastre</b>	Helio, flujo 1.1 mL/min
<b>Rampa de temperatura del horno</b>	42 °C por 1.30 min, luego 5.5 °C/min hasta 330 °C, 10 min de espera
<b>Temperatura de la línea de transferencia</b>	230 °C
<b>Temperatura de fuente de iones</b>	230 °C
<b>Impacto electrónico</b>	70 eV
<b>Intervalo de unidades de masa atómica</b>	50-450 u.m.a.
<b>Inyector</b>	1-2 µL. Sin divisor de flujo (Splitless) a 325 °C

### 2.2.2. Método de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM).

Para desarrollar el método SIM se preparó un coctel con los siguientes alcanos lineales: decano, tridecano, hexadecano, nonadecano, docosano, hexacosano y triacontano a concentraciones aproximadamente de 0.1 mg/mL. A partir de los tiempos de retención se armó el método SIM.

En el Cuadro VI se muestra los datos de los grupos, iones y tiempos de retención para armar el método de monitoreo de iones.

**Cuadro VI.** Grupos de iones de acuerdo a tiempos de retención utilizados para crear el método SIM.

Grupo	Identificación de grupo (CX)	Tiempo de retención (min)	Iones
1	--	3.00	83, 85, 138
2	C10	11.45	83, 85, 123, 128, 134, 142, 148, 152, 166, 180, 194
3	C13	18.71	83, 85, 123, 152, 154, 156, 162, 166, 168, 170, 176, 180, 184, 190, 194
4	C16	25.34	83, 85, 178, 180, 184, 190, 191, 192, 194, 198, 208, 212, 240
5	C19	31.47	83, 85, 191, 192, 202, 206, 208, 212, 215, 216, 219, 220, 226, 234, 240
6	C22	36.43	83, 85, 191, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 228, 230, 231, 234, 240, 242, 244, 256
7	C26	42.17	83, 85, 191, 205, 217, 218, 231, 242, 244, 252, 256, 270, 284
8	C30	47.16	83, 85, 191, 205, 217, 218, 231, 276, 278

### 2.2.3. Optimización:

Se realizó pruebas de verificación en cuanto a la identificación y resolución del equipo utilizando diferentes compuestos, entre estos se pueden mencionar: nonano, decano, naftaleno, dodecano, bifenilo, fluoreno, antraceno, fenantreno, nonadecano, eicosano, heneicosano, pireno, docosano, tricosano, tetracosano, criseno, pentacosano, hexacosano, octacosano, triacontano, dotriacontano, hexatriacontano, octatriacontano, tetracontano, pristano, fitano, tridecano, hexadecano. Todos se prepararon a 100 mg/L.

Seguido a esto se preparó muestras de búnker de acuerdo al proceso de extracción para evaluar la concentración de inyección. Para esto se utilizó diferentes volúmenes entre 25 µL y 300 µL para la purificación de la muestra explicada en la

sección 2.1.3 y se definió la concentración óptima para obtener la mejor resolución posible.

Uno de los factores a optimizar era la rampa de temperatura del horno que establecía el método inicial, ya que por limitaciones en cuanto a pruebas que se realizan en el cromatógrafo utilizado no se podía aumentar de 300 °C. Este factor se corrigió al mantener la temperatura del horno a 300 °C durante un periodo de tiempo superior al establecido por la metodología como tiempo de espera.

### **2.3. Validación.**

Para la validación del método se contemplaron los parámetros de mérito que se indicaban en la metodología CEN/TR 15522-2. Se validó por lo tanto la linealidad, la precisión y la repetibilidad del método.

#### **2.3.1. Linealidad del equipo.**

En cuanto a la validación de la linealidad se preparó un coctel que contenía los siguientes alcanos lineales: nonadecano, eicosano, heneicosano, tricosano, tetracosano, pentacosano, octacosano y triacontano, y de ese coctel se prepararon estándares a tres niveles de concentración entre 0.5 mg/L y 50.0 mg/L. Tomando como base la norma europea se realiza la curva de calibración en solo tres puntos por triplicado.

Para la preparación del coctel se pesó en una balanza analítica cerca de 0.02500 g de cada uno de los estándares en un balón aforado de 50.00 mL y se aforó con hexano. A partir de ese coctel se tomó una alícuota de 1.25 mL para el segundo estándar, una de 2.50 mL para el tercer estándar y una alícuota de 0.25 mL del tercer estándar, para preparar el primer estándar, estos se realizaron en balones de 25.00 mL y se aforaron con hexano. En el Cuadro VII se muestra la concentración de cada uno de estos estándares.

**Cuadro VII.** Concentraciones de los estándares preparados para evaluar la linealidad del método.

Compuesto	Estándar 1 mg/L (± 0.03)	Estándar 2 mg/L (± 0.4)	Estándar 3 mg/L (± 0.4)
Nonano	0.52	25.8	51.7
Eicosano	0.56	28.2	56.4
Heneicosano	0.59	29.5	58.9
Tricosano	0.53	26.4	52.7
Tetracosano	0.56	28.0	56.0
Pentacosano	0.52	26.1	52.3
Octacosano	0.57	28.3	56.5
Triacontano	0.56	28.2	56.4

Se procedió a inyectar en el método de huella digital de búnker en el CG-MS las tres curvas de calibración y se realizó gráficos con las curvas de calibración. Se calculó además el coeficiente de correlación. Se definió como parámetro de aceptación del coeficiente de correlación 0.9850, esto debido a la naturaleza de la muestra, además la metodología de la ASTM no establece ningún parámetro de aceptación por la naturaleza semi cuantitativa del método<sup>54</sup>.

Se puede utilizar para verificar que existe una correcta correlación entre los datos una prueba t de student. En esta, la hipótesis nula es que no existe correlación entre las variables del eje "x" y las variables del eje "y", si el t calculado es mayor al t tabulado para n-2 grados de libertad en un contraste de 2 colas, se rechaza la hipótesis nula<sup>55</sup>. La prueba t a aplicar en este caso es la siguiente:

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

### 2.3.2. Precisión.

Para evaluar la precisión en condiciones de repetibilidad se utilizó el estándar de concentración media preparado para estudiar la linealidad del método (estándar 2).

Se inyectó el patrón un total de ocho veces y con el área de cada compuesto se procedió a calcular un coeficiente de variación para cada uno. Se estableció como parámetro de aceptación máximo un 5 %<sup>1</sup>.

### **2.3.3. Repetibilidad método.**

Para evaluar la repetibilidad del método se procedió a preparar una muestra de búnker por duplicado, siguiendo el método de extracción descrito anteriormente. Se evaluó mediante el coeficiente de variación entre las relaciones de diagnóstico de las réplicas.

Se inyectó en el cromatógrafo de gases y se calcularon las relaciones de diagnóstico. Se definió que el coeficiente de variación entre las relaciones de diagnóstico de cada réplica debía ser menor a un 5 %<sup>1</sup>.

### **2.4. Análisis de datos.**

Con el programa MSD ChemStation versión E.02.00.493 se trabajó la integración de las señales cromatográficas de los iones. De cada muestra inyectada se analizaron 16 cromatogramas de iones correspondientes a las señales cromatográficas de los grupos de compuestos mostrados en el Cuadro I.

Se identificó basándose en los cromatogramas presentes en la metodología europea los tiempos de retención y conjunto de señales cromatográficas para la integración, y se procedió a realizar el proceso manualmente para cada muestra, se asignó a cada señal cromatográfica o grupo de señales un número.

Una vez obtenidas las áreas se procedió a utilizar la hoja de cálculo que se propuso realizar como parte de los objetivos con el fin de manejar los datos obtenidos del análisis. Para la elaboración de la hoja de cálculo se utilizó el programa de computo de Excel ®.

Inicialmente se definió las relaciones masa-carga a utilizar para los cálculos basándose en la norma europea. En la Figura 8 se observa la primera sección de la hoja de cálculo, donde *Ion* indica la relación masa-carga, *referencia* indica el número de identificación asignado para la integración. Se debe colocar las áreas de un blanco medido y las áreas para la muestra y su duplicado. La hoja de cálculo utiliza el valor corregido para el área para realizar los cálculos posteriores.

Muestra							M1	Muestra							Blanco
<i>Ion</i>	<i>Referencia</i>	<i>Grupo</i>	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>		<i>Ion</i>	<i>Referencia</i>	<i>Grupo</i>	<i>Área 1</i>				
212	48	C2 Dibenzotiofenos			0,00	0,00		212	48	C2 Dibenzotiofenos					
226	51	C3 Dibenzotiofenos			0,00	0,00		226	51	C3 Dibenzotiofenos					
206	50	C2 Fenantrenos antracenos			0,00	0,00		206	50	C2 Fenantrenos antracenos					
220	52	C3 Fenantrenos antracenos			0,00	0,00		220	52	C3 Fenantrenos antracenos					
230	56	C2 Fluorenos pirenos			0,00	0,00		230	56	C2 Fluorenos pirenos					
242	60	C1 crisenos			0,00	0,00		242	60	C1 crisenos					
	7	2MP			0,00	0,00			7	2MP					
192	47	MA			0,00	0,00		192	47	MA					
	8	1MP			0,00	0,00			8	1MP					
	49	Pico más alto			0,00	0,00			49	Pico más alto					
198	5	4-MDBT			0,00	0,00		198	5	4-MDBT					
	6	1-MDBT			0,00	0,00			6	1-MDBT					
	1	C17			0,00	0,00			1	C17					
85	2	Pristano			0,00	0,00		85	2	Pristano					
	3	C18			0,00	0,00			3	C18					
	4	Fitano			0,00	0,00			4	Fitano					
	53	C4 Fenantrenos			0,00	0,00			53	C4 Fenantrenos					
234	11	Reteno			0,00	0,00		234	11	Reteno					
	16	Tetrametil fenantreno			0,00	0,00			16	Tetrametil fenantreno					
	17	BNT			0,00	0,00			17	BNT					
	9	2-MFL			0,00	0,00			9	2-MFL					
	10	BaF			0,00	0,00			10	BaF					
216	12	Benzofluoreno			0,00	0,00		216	12	Benzofluoreno					

Figura 8. Primera sección de la hoja de cálculo elaborada.

En una segunda sección de la hoja elaborada se calculan las relaciones de diagnóstico, esta parte se realizó basándose en las relaciones de diagnóstico que establece la norma. Se utiliza como indicador de la relación la fracción del número de señal (identificado previamente) para dos réplicas, por ejemplo, la relación  $\frac{1}{2}$  es el área de la señal cromatográfica identificado como 1 dividida entre el área de la señal cromatográfica 2; de la Figura 8 se puede observar que es el área del heptadecano entre el área del pristano para el ion 85.

Se coloca una condicional que torna el color de la celda verde o roja, dependiendo de si el coeficiente de variación entre las relaciones de diagnóstico de cada réplica es menor o mayor a un 5 % respectivamente. En la Figura 9 se muestra una imagen de esta sección y la condicional agregada.



Figura 9. Segunda sección de la hoja de cálculo generada.

En la tercera sección de la hoja elaborada se calcula el coeficiente de variación entre cada una de las réplicas de las muestras con la posible fuente del derrame de búnker. La hoja calcula el coeficiente de variación para el valor de relación de diagnóstico de la réplica 1 de la muestra de búnker y la posible fuente de contaminación; igual lo realiza para la réplica 2.

Se colocó una condicional para que aparezca la palabra igual o la palabra diferente en una celda que resume los resultados de los cálculos numéricos (comparación Fuente.M1 en Figura 10). La palabra igual indica que el coeficiente

de variación es menor al 14% y por lo tanto se puede considerar que las muestras son iguales y la palabra diferente implica que el coeficiente de variación es mayor al 14% y la muestra y la fuente son diferentes.

En la Figura 10 se muestra una imagen de la tercera sección de la hoja de cálculo donde se puede observar la fórmula utilizada para colocar la palabra igual y diferente.

Réplica 1				Réplica 2			Comparación Fuente-M1	
Relaciones de diagnóstico	Comparación muestra		Fuente/1	Comparación muestra		Fuente/1	Réplica 1	Réplica 2
	Desv. Estandar	Promedio	CV	Desv. Estandar	Promedio	CV		
1/2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
3/4	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
2/4	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
5/6	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
7/8	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
9/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
10/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
12/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
13/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

Figura 10. Tercera sección de la hoja de cálculo elaborada.

La norma establece que si el coeficiente de variación para todas las relaciones de diagnóstico son iguales (menores al 14 %), la muestra se puede relacionar con la fuente del derrame. Basándose en esto, en una cuarta sección la hoja de cálculo indica si las muestras son iguales o no, al final de la tercera sección se agregó una función que suma la cantidad de iguales y diferentes (ver Figura 11).

=CONTAR.SI(I4:I51;"igual")									
B	C	D	E	F	G	H	I	J	
30d/31	#¡DIV/0!								
69/31	#¡DIV/0!								
31abs/31	#¡DIV/0!								
Iguales								0	0
Diferentes								0	0

**Figura 11.** Suma de iguales y diferentes en la tercera sección.

La cuarta sección utiliza la información de la celda "diferentes" para dar una conclusión, dependiendo de si el valor es igual a cero o no. En la siguiente figura se puede observar una imagen de esta sección de la hoja de cálculo.

=SI(CV!I53=0;"No hay diferencia"; "Hay diferencia")	
B	C
Fuente-M1	No hay diferencia
Fuente-M1	No hay diferencia
Fuente-M2	No hay diferencia
Fuente-M2	No hay diferencia

**Figura 12.** Cuarta sección de la hoja de cálculo elaborada.

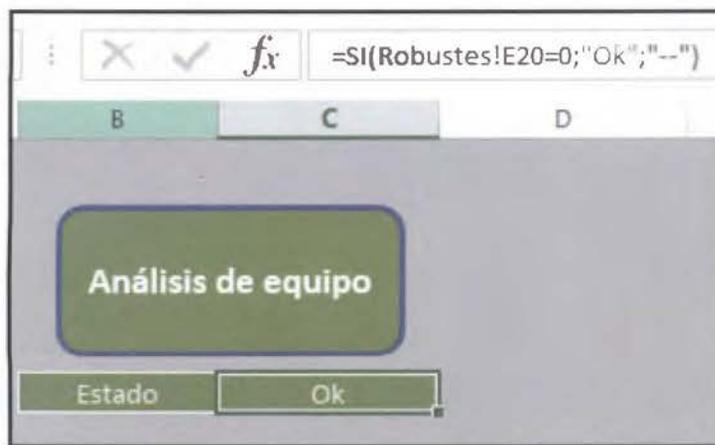
Se incluyó adicional a esto una sección para comprobar que el equipo está funcionando de manera correcta. Para esto se debe inyectar un estándar de alcanos al inicio y al final de cada bloque de análisis de muestras y colocar el área para cada componente en la hoja de cálculo, el coeficiente de variación de estos datos debe

ser menor al 5 %. Se agregó una función que indica que el valor es aceptado o rechazado para cada componente.

Alcanos	Área inicial	Área final	CV	Estado
			#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

Figura 13. Sección quinta de la hoja de cálculo elaborada.

Al igual que en el caso anterior se agregó una función para sumar la cantidad de datos rechazados, si no existen datos rechazados se indica en la página principal que el equipo se encuentra en buen estado.



**Figura 14.** Parte de hoja de cálculo que indica el estado del cromatógrafo de gases y su respectiva función.

## 2.5. Verificación de metodología mediante análisis de muestras ciegas.

Se procedió a trabajar con muestras ciegas. Se preparó un total de 6 incógnitas identificadas con las letras de la A a la F. En el Cuadro VIII se da una descripción de cada vial.

**Cuadro VIII.** Descripción de muestras ciegas.

Vial	Descripción
A	Búnker en agua
B	Búnker puro
C	Búnker puro
D	Búnker puro
E	Búnker puro
F	Búnker en agua

Para las muestras de la B a la E se pesó utilizando una balanza analítica con precisión de 0.01 mg una masa cercana a los 125 mg, esta masa se disolvió en 1.00 mL de diclorometano. Los pasos seguidos para su preparación se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Pasos seguidos para la preparación de las muestras de búnker en el análisis de muestras ciegas.

Para las muestras A y F se realizó una extracción líquido-líquido utilizando diclorometano como disolvente, se realizaron tres extracciones con 20 mL cada una, se separó la fase orgánica y se descartó la acuosa. Los pasos seguidos para su preparación se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** Pasos seguidos para la preparación de las muestras de búnker con agua en el análisis de muestras ciegas.

Una vez que se trabajó la parte de extracción e inyección se procedió a analizar los cromatogramas obtenidos de acuerdo a los cálculos que se explican en el capítulo 4.

## Capítulo 3: Resultados y discusión

### 3.1. Optimización del método:

Inicialmente se preparó un coctel con diferentes compuestos presentes en el petróleo. Se trabajó en la separación de estos compuestos con el cromatógrafo de gases acoplado a masas, esto con el fin de verificar la correcta identificación de los mismos mediante comparación de los espectros de masa obtenidos y los de la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology) con la que cuenta el software ChemStation (programa utilizado para el tratamiento de los datos y cromatogramas). Se logró identificar con un alto porcentaje de acierto los compuestos. En Cuadro IX se muestran los compuestos utilizados y el porcentaje de similitud entre los espectros de masa.

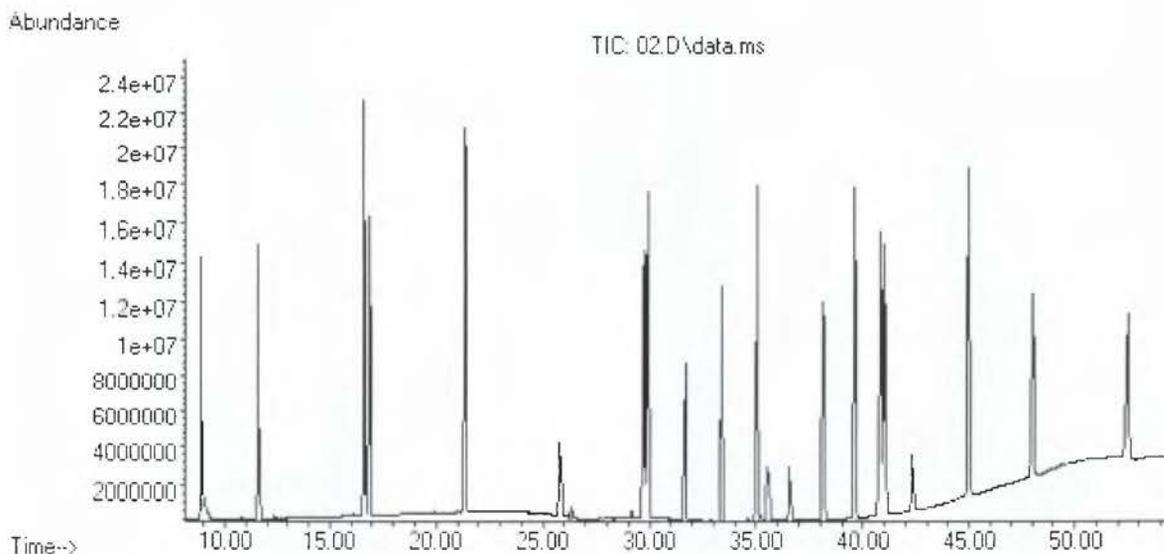
**Cuadro IX.** Porcentajes de acierto para los compuestos utilizados en la optimización del método.

Compuesto	Match	Compuesto	Match	Compuesto	Match
Nonano	97.4	Eicosano	98.6	Triacotano	95.1
Decano	98.0	Heneicosano	98.6	Dotriacotano	90.5
Naftaleno	99.6	Pireno	98.1	Tridecano	96.7
Dodecano	98.3	Docosano	96.1	Hexadecano	96.7
Bifenilo	98.6	Tricosano	96.8	Pristano	96.6
Fluoreno	96.5	Tetracosano	98.9		
Antraceno	98.2	Criseno	95.8		
Fenantreno	99.3	Pentacosano	96.5		
Nonadecano	97.0	Hexacosano	95.0		
Fitano	98.7	Octacosano	97.9		

Estos altos valores indican que con la utilización de un espectrómetro de masas como detector la identificación de las señales cromatográficas es adecuada,

por lo que al analizar muestras de búnker o petróleo se va a lograr la correcta identificación de los grupos necesarios para esta técnica de huella digital.

En la Figura 17 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos en la optimización del método.



**Figura 17.** Cromatograma obtenido en la optimización del método bajo las condiciones descritas en el cuadro V, temperatura final horno 300 °C.

De la Figura 17 se puede observar como las señales cromatográficas presentan una forma definida y una correcta separación para la mayoría de los casos, si se quisiera realizar una identificación y cuantificación individual se podría hacer al utilizar este método.

### 3.2. Extracción de la muestra.

Antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases para su análisis de huella digital es necesario realizar una extracción de los componentes de interés ya que el crudo de petróleo y sus productos refinados presentan compuestos de alto

punto de ebullición que no pueden ser analizados por cromatografía de gases. Los compuestos de alto punto de ebullición no eluyen de la columna capilar del cromatografo, lo cual influye en el rendimiento del inyector, la columna y el detector. Se recomienda además de la extracción, la purificación de las muestras para eliminar las interferencias en la matriz, para el análisis en CG-MS utilizando alúmina y/o florisil. Si la concentración en la muestra de algunos compuestos, como lípidos o ácidos grasos, en la muestra es muy alta, puede ser necesario limpiar los extractos utilizando una columna de alúmina.

La alumina se suele utilizar para compuestos como los hidrocarburos, debido a que son compuestos no polares con interferencias polares<sup>53</sup>.

Es por este motivo, dentro del protocolo inicial de tratamiento de la muestra se realiza el proceso de extracción y purificación por alúmina, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.1, con el fin de proteger el equipo (puerto de inyección, columna cromatográfica y el detector) de compuestos presentes en el búnker y petróleo analizado, que no sean volátiles a las temperaturas de trabajo.

Como parte de la optimización, se verificó la concentración óptima de muestra a inyectar en el cromatógrafo, sin que se vieran afectadas las señales cromatográficas obtenidas, para esto en la columna de purificación por alúmina se eluyeron muestras en un intervalo de 25  $\mu$ L a 300  $\mu$ L. Se trabajó con la menor concentración, pues no se obtenía una buena resolución al trabajar a concentraciones altas para algunos iones.

Cuando se trabaja con un método analítico donde se incluye un proceso de extracción, se debe evaluar un porcentaje de recuperación, en este caso no se realizó debido a que el método es semi-cuantitativo y lo que interesa la relación entre distintas áreas.

### **3.3. Validación de la metodología.**

Basándose en lo indicado en la metodología europea<sup>1</sup> en la validación se contemplaron solo tres parámetros, respondiendo a la naturaleza semi-cuantitativa del método. Por lo tanto, se trabajó con los siguientes parámetros de mérito: linealidad, precisión y repetibilidad del método.

Luego de realizar el proceso de la validación de los tres parámetros se puede concluir que se demuestra que el mismo es adecuado para el uso previsto.

#### **3.3.1. Validación de la linealidad.**

La linealidad se ensayó al inyectar patrones en tres niveles de concentración de alcanos lineales (0.5 mg/L, 25 mg/L y 50 mg/L), la misma se evaluó mediante el coeficiente de correlación para los tres niveles de concentración, además de una prueba t. Las concentraciones de los estándares utilizados para evaluar la linealidad son las mostradas en el Cuadro VII.

Como resultado del análisis de la linealidad se obtuvo en la mayoría de los casos una correlación alta con coeficientes mayores a 0.99. En el Cuadro X se pueden observar los valores de coeficiente de correlación obtenidos en la evaluación de la linealidad.

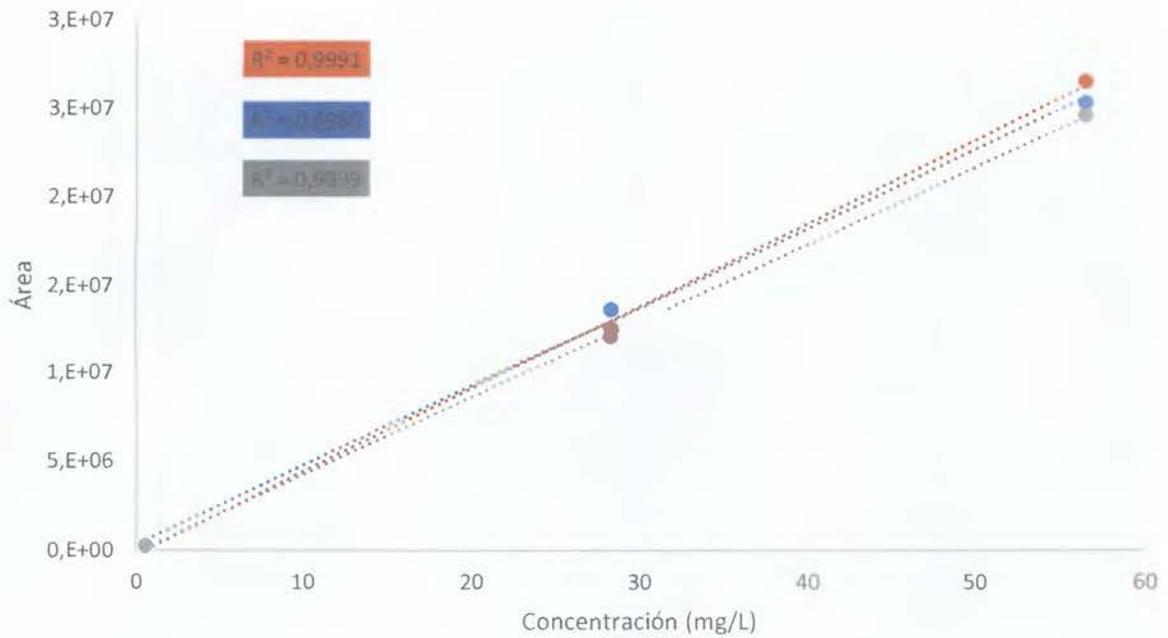
**Cuadro X.** Resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del método.

Compuesto	Coeficiente de correlación (r)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Nonadecano	0.9977	0.9998	0.9969
Eicosano	0.9976	0.9979	0.9999
Heneicosano	0.9996	0.9992	0.9987
Tricosano	0.9995	0.9858	0.9872
Tetracosano	0.9998	0.9998	0.9981
Pentacosano	0.9905	0.9971	0.9905
Octacosano	0.9991	0.9980	0.9999
Triacotano	<b>0.9948</b>	0.9916	0.9929

Este coeficiente muestra la correlación existente entre un par ordenado de datos, por lo tanto, se observa que en todos los casos existe una buena correlación y que el método en sí muestra una linealidad adecuada.

La norma europea<sup>1</sup> utilizada como referencia no define un valor para aceptación del parámetro de linealidad, sin embargo, al consultar otras normas como la ASTM no se hace referencia a un valor de aceptación debido a la naturaleza semi-cuantitativa de la metodología, por lo tanto, se define como parámetro un 0.9850 debido a que el petróleo y el búnker representan matrices complejas de trabajar por a la gran cantidad de compuestos que presentan.

En la Figura 18 se muestra la curva de calibración para el octacosano, los demás gráficos se muestran en el anexo 1.



**Figura 18.** Curva de calibración para el octacosano obtenida por GC-MS.

Ya que no existe un valor de aceptación para el parámetro de linealidad normado, se utiliza una prueba de t de student para evaluar el cumplimiento de este parámetro.

Al realizar una prueba t de student bajo el modelo presentado en la ecuación [1] se obtiene que el t calculado es mayor al t tabulado para 7 grados de libertad en un contraste de 2 colas con un 95 % de confianza, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la correlación es adecuada. En el Cuadro XI se observan los valores de t calculados.

**Cuadro XI.** Valores obtenidos para la prueba estadística de linealidad t de student.

<b>Compuesto</b>	<b>t calculado</b>
Nonadecano	49.99
Eicosano	70.71
Heneicosano	35.35
Tricosano	31.61
Tetracosano	49.99
Pentacosano	13.10
Octacosano	70.71
Triacontano	9.77
<b>t tabulado</b>	<b>2.37</b>

Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad se concluye que la misma es conforme de acuerdo a lo establecido y confirma la adecuación del método para el uso previsto.

### **3.3.2. Estimación de la precisión del instrumento, en condiciones de repetibilidad.**

La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV); se definió como parámetro aceptable un 5 % como máximo de variación entre las áreas para cada alcano lineal. Se definió tomando de referencia la norma europea<sup>1</sup> que establece este valor como criterio de aceptación.

Esta precisión se ensayó al inyectar un total de ocho veces un estándar de alcanos lineales de concentración media (respecto a la curva de calibración utilizada en el caso de la linealidad). Este valor (5 %) se establece en la metodología europea<sup>1</sup> y obedece a que lo que se inyecta en el sistema cromatográfico para la separación es una misma disolución en repetidas ocasiones, por lo que la variación en los resultados obtenidos debería ser mínima.

Los datos obtenidos se muestran en el Cuadro XII y se puede observar como resultado principal que la precisión del método es adecuada para el uso previsto.

**Cuadro XII.** Resultados obtenidos en la evaluación de la precisión del método.

<b>Compuesto</b>	<b>Coefficiente de variación (%)</b>
Nonadecano	4.1
Eicosano	5.0
Heneicosano	3.9
Tricosano	4.6
Tetracosano	4.2
Pentacosano	3.7
Octacosano	4.8
Triacotano	3.8

Ya los valores de CV son menores al 5 %, valor establecido como criterio de aceptación, por lo tanto, se puede dar como conforme la evaluación de este parámetro.

Con estos valores se observa como la variación entre cada una de las inyecciones al utilizar un auto inyector no afecta los resultados obtenidos por el método. Los datos completos se muestran en el Anexo 1.

### **3.3.3. Repetibilidad del método.**

La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis de duplicados de muestras de búnker, se preparó independientemente una muestra por duplicado. Se definió como parámetro de aceptación un 5 % como máximo de coeficiente de variación en las relaciones de diagnóstico. Este valor es definido así en la norma europea que se utiliza como método de referencia.

En el Cuadro XIII se muestran los valores de CV obtenidos para algunas relaciones de diagnóstico producto del análisis por duplicado una muestra de búnker.

**Cuadro XIII.** Coeficientes de variación producto del análisis de las relaciones de diagnóstico de duplicados de una muestra de búnker.

<b>lón</b>	<b>Coeficiente de variación (%)</b>
198	2.8
192	2.1
216	1.6
218	4.0
231	1.0
123	1.9
212	3.0
226	0.3

Los resultados obtenidos por el análisis demuestran que la repetibilidad del método es adecuada y no afecta los resultados al obtener coeficientes de variación inferiores al 5 %, valor definido como criterio de aceptación.

Para la evaluación de este parámetro se utilizaron muestras reales, por lo tanto, se identificó señales y se calculó relaciones de diagnóstico. Para esto se tomó como referencia lo planteado en la norma europea CEN/TR 15522-2.

Con la evaluación de este parámetro se puede concluir que el mismo es conforme de acuerdo a los criterios establecidos de aceptación.

### **3.4. Identificación de compuestos y grupos de compuestos según cromatogramas de iones.**

Una vez validado el método se procedió a la preparación de muestras de búnker con el fin de obtener la huella digital de muestras de diferentes fuentes y compararlas según las señales de los cromatogramas de iones.

Se trabajó con diferentes muestras de búnker y de petróleo, para su extracción y purificación se utilizó el método indicado en la sección 2.1.

Una vez extraídas las muestras se procedió a inyectarlas en el cromatógrafo de gases de acuerdo con el método optimizado que se utilizó en la validación.

Una vez finalizado el proceso de separación cromatográfica y detección con el método SIM en el espectrómetro de masas, se analizó los cromatogramas de los siguientes iones (relación masa carga): 212, 226, 206, 220, 230, 242, 192, 198, 85, 234, 216, 217, 218, 231 y 191. Estos iones corresponden a los cromatogramas principales aislados por el método SIM, de los compuestos de mayor importancia en el estudio de huella digital, como lo son los HAP, biomarcadores y alcanos.

Cabe destacar que se trabaja con estos compuestos debido a las propiedades características que presentan, las cuales los convierten en compuestos de importancia en los procesos de envejecimiento, debido a su baja reactividad como los biomarcadores, o debido a su lenta degradación como los HAP respecto a otros componentes en el búnker o petróleo.

De los resultados obtenidos experimentalmente se demuestra que con estos compuestos se puede trabajar adecuadamente en el estudio de la huella digital, lo que demuestra a su vez las propiedades que describen a estos compuestos en cuanto a estabilidad en los procesos.

### **3.5. Grupos de interés en la determinación de la huella digital del búnker.**

En general, los compuestos que pueden ser necesarios en la identificación de una fuente de petróleo son los siguientes:

- Hidrocarburos saturados, incluidos los *n*-alcanos e isoprenoides como pristano y fitano<sup>56,57</sup>.
- BTEX (Benceno, tolueno, etilbenceno, xileno) y los bencenos alquilados<sup>56,57</sup>.
- PAH y los PAH alquilados, especialmente los C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> (naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno y la serie de los crisenos). Los PAH alquilados son una base muy importante en la caracterización química e identificación en los derrames de petróleo<sup>56,57</sup>.
- Biomarcadores: terpenos y esteranos principalmente<sup>56,57</sup>.

Entre los criterios que se utilizan para realizar la selección de las relaciones de diagnóstico se encuentran<sup>58</sup>:

- Especificidad y diversidad.
- Resistencia a los procesos de envejecimiento.
- Se utilizan relaciones entre compuestos con una misma relación carga masa.

En la norma europea<sup>1</sup> utilizada como referencia se facilitan cromatogramas de estudios realizados con diversos tipos de petróleo, y se indican las relaciones de diagnóstico más importantes con las que se debe de trabajar. Al analizar muestras de búnker experimentalmente se obtuvo como resultado principal que muchos de los cromatogramas presentaban semejanzas, lo que facilitó la identificación de las señales cromatográficas y grupos de las mismas.

Una vez que se identificó las señales cromatográficas para cada uno de los iones en estudio se realizó una caracterización de cada cromatograma para facilitar el cálculo de las relaciones de diagnóstico.

Con base en los cromatogramas que se muestran en las siguientes secciones se calcularon las relaciones de diagnóstico para la identificación de muestras de búnker por comparación de sus huellas digitales.

Dentro del grupo de los HAP más importantes tal y como se mencionó anteriormente se encuentran el naftaleno, el fenantreno, el dibenzotiofeno, el fluoreno y la serie de los crisenos. Estos compuestos son de suma importancia

debido a que son los que se afectan en menor medida por los procesos de envejecimiento. En las siguientes figuras se observan las señales cromatográficas de los compuestos identificados como PAH que se utilizan en el cálculo de las relaciones de diagnóstico en el presente método.

### 3.5.1. C2- Dibenzotiofenos.

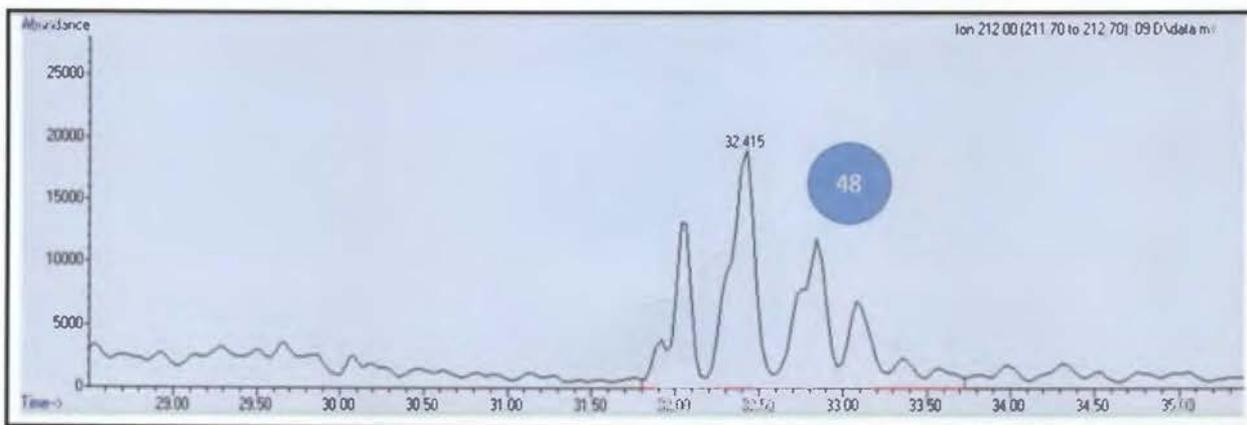


Figura 19. Cromatograma de iones obtenido para el ion 212.

### 3.5.2. C3-Fenantrenos/Antracenos

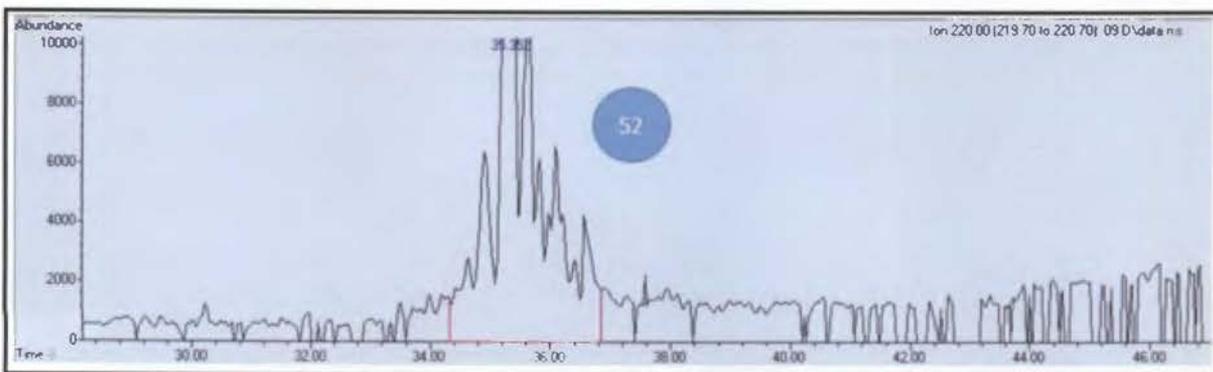


Figura 20. Cromatograma de iones obtenido para el ion 220.

### 3.5.3. C2- Fluorantenos/Pirenos.

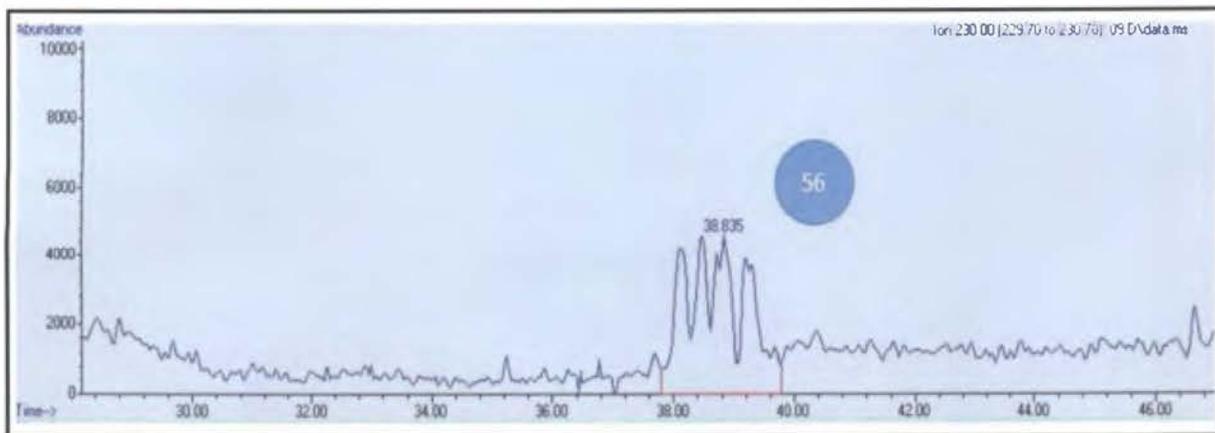


Figura 21. Cromatograma de iones obtenido para el ion 230.

### 3.5.4. C4- Fenantrenos.

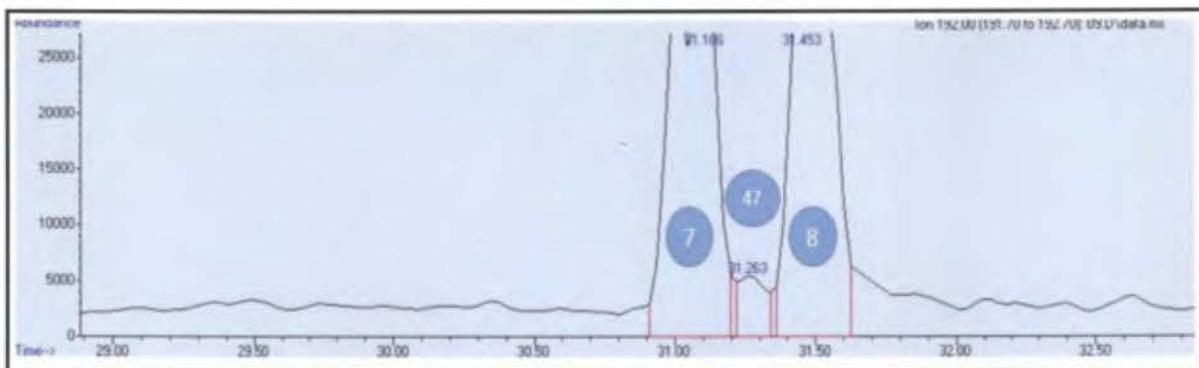


Figura 22. Cromatograma de iones para el ion 192.

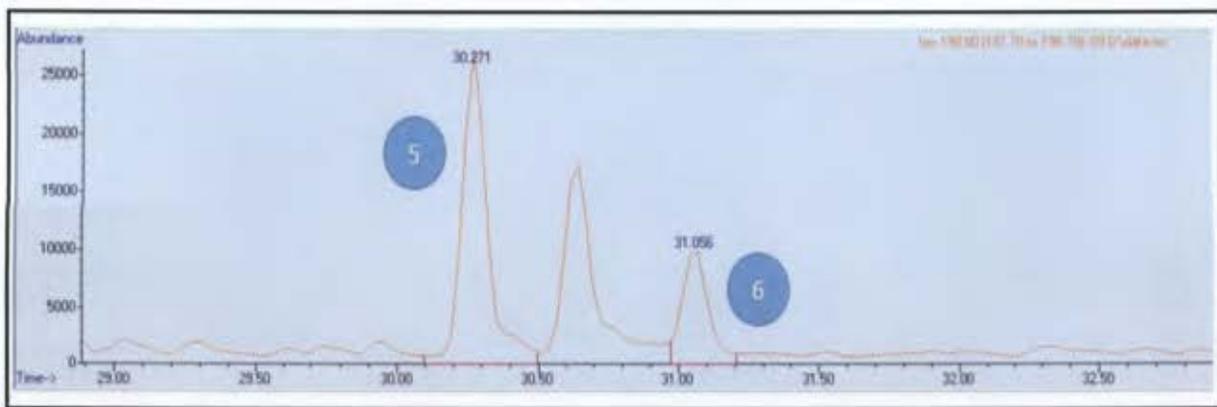


Figura 23. Cromatograma de iones obtenido para el ion 198

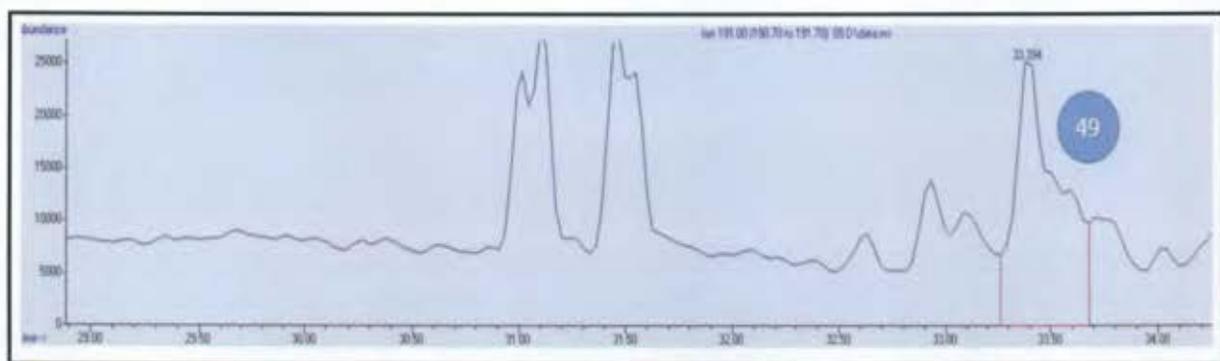


Figura 24. Cromatograma de iones obtenido para el ion 191.

### 3.5.5. C4-Fenantrenos/Antracenos.

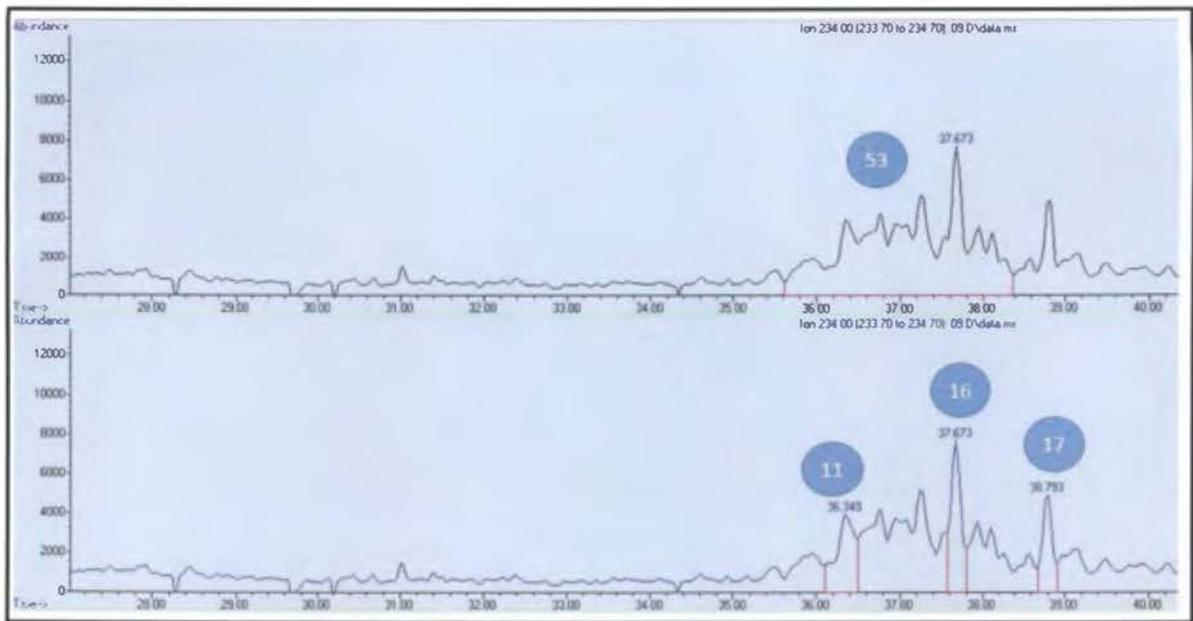


Figura 25. Cromatograma de iones para el ion 234.

### 3.5.6. C3 Dibenzotiofenos.

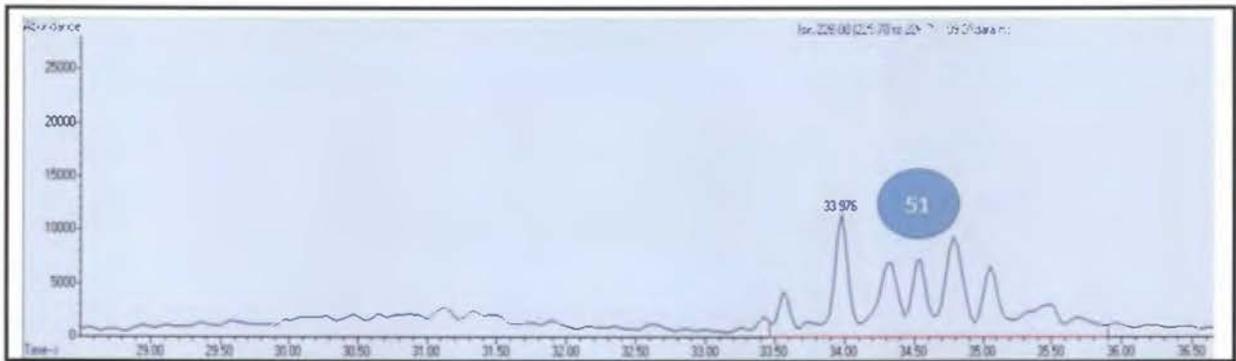


Figura 26. Cromatograma de iones obtenido para el ion 226.

### 3.5.7. C1 Crisenos.

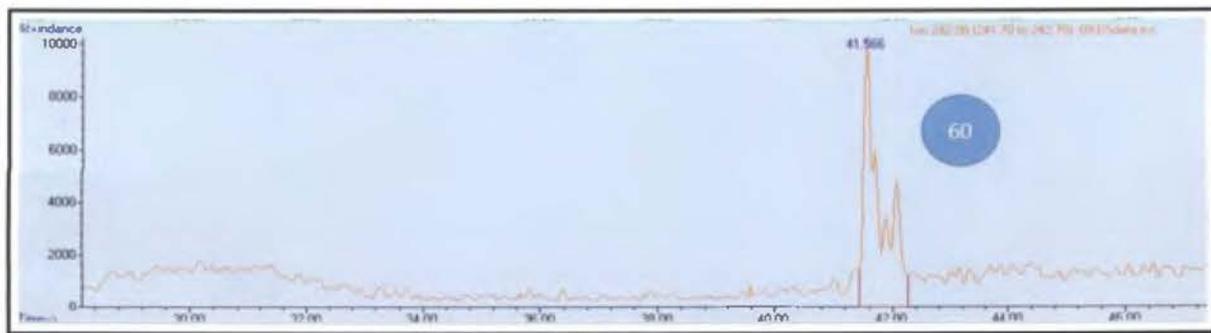


Figura 27. Cromatograma de iones obtenido para el ion 242.

### 3.5.8. N- Alcanos.

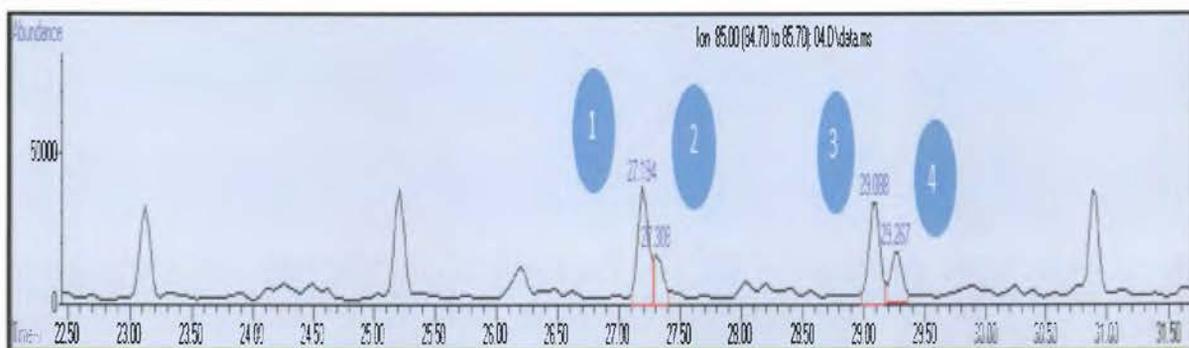


Figura 28. Cromatograma de iones obtenido para el ion 85.

Otro de los grupos importantes con los que se trabaja es con los biomarcadores, estos se utilizan debido a que no presentan cambios estructurales, y son estables a los procesos de envejecimiento. En este trabajo se utilizan las relaciones de diagnóstico de los terpenos y los esteranos. En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas de los grupos de los biomarcadores utilizados en el cálculo de las relaciones de diagnóstico.

### 3.5.9. Ion 216.

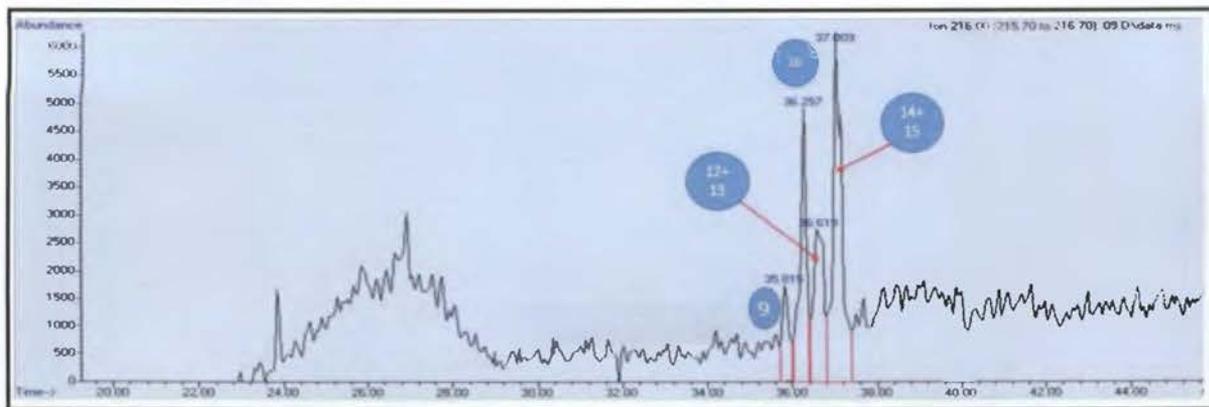


Figura 29. Cromatograma de iones para el ion 216.

### 3.5.10. Ion 123.

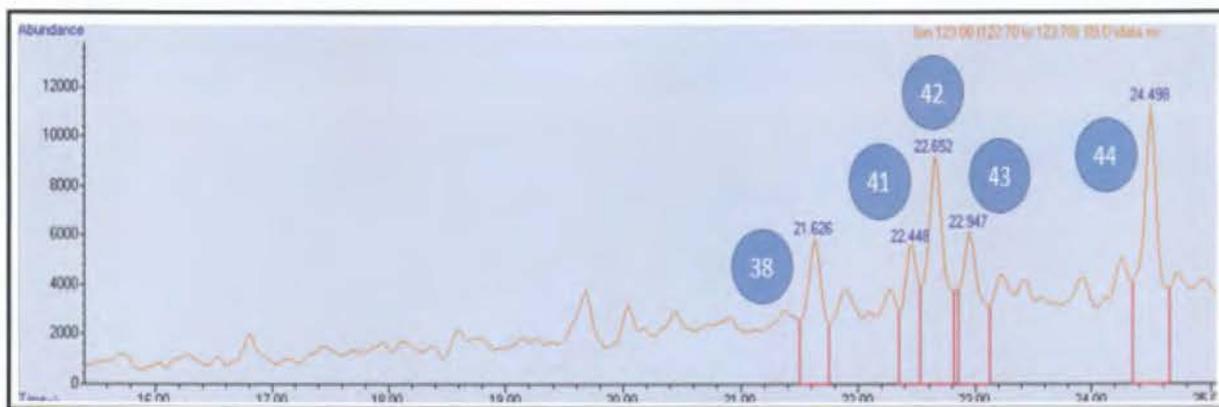


Figura 30. Cromatograma de iones obtenido para el ion 123.

3.5.11. Ion 217.

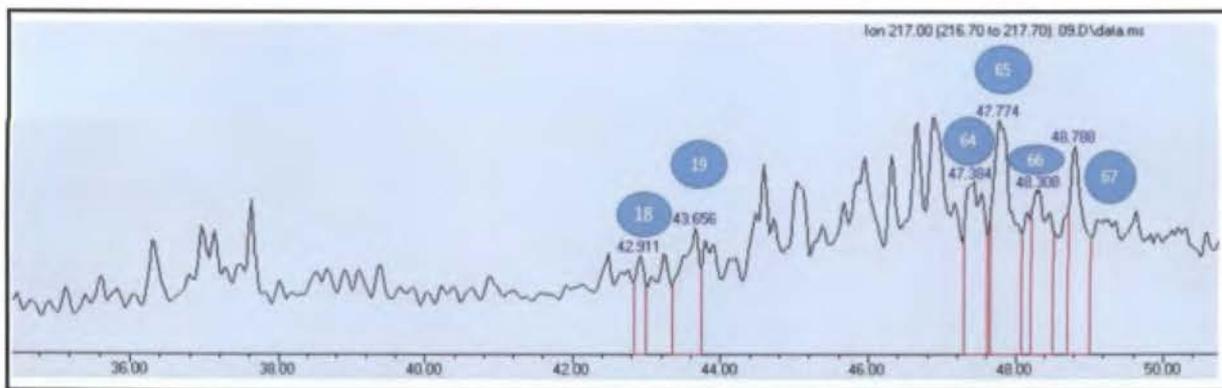


Figura 31. Cromatograma de iones obtenido para el ion 217.

3.5.12. Ion 218.

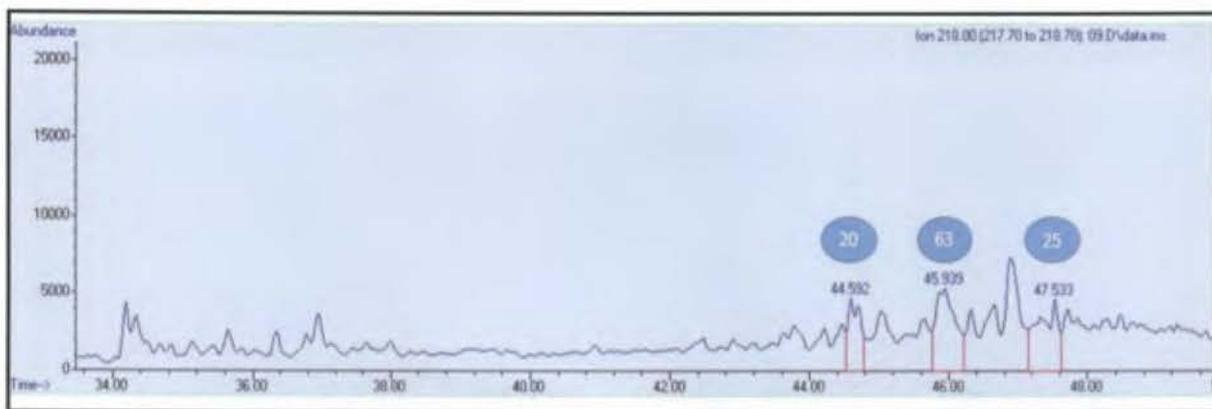


Figura 32. Cromatograma de iones obtenido para el ion 218.

### 3.5.13. Ion 231.

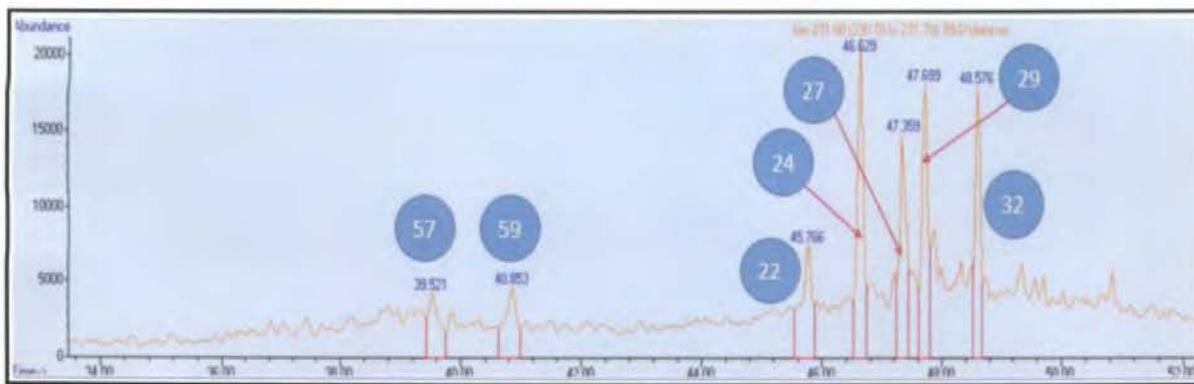


Figura 33. Cromatograma de iones obtenido para el ion 231.

### 3.6. Relaciones de diagnóstico.

A partir de la integración de los picos y grupos de picos que se muestran en la sección anterior, se procedió a calcular las relaciones de diagnóstico que se indican en el Cuadro XIV.

Cada relación de diagnóstico corresponde al área de un compuesto o grupo de compuestos entre el área de otro compuesto o grupo de compuestos. Se encuentran definidos así en la norma europea<sup>1</sup>.

**Cuadro XIV.** Relaciones de diagnóstico a calcular en la comparación de la huella digital del búnker (los números corresponden a los mostrados en la sección anterior).

Relación de diagnóstico	Compuestos	Grupo	Ion
<b>Biomarcadores</b>			
57/59	C 20-esterano triaromático/ C 21-esterano triaromático	Esterano	231
59/24	C 21-esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
22/24	C 26, 20 S- esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
27/24	C 28, 20 S- esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
29/24	C 27, 20R-esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
32/24	C 28, 20 R- esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
59/32	C 21- esterano triaromático/ C 28, 20 R- esterano triaromático	Esterano	231
22/27	C 26-esterano triaromático/C 28, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
29/32	C 27, 20 R- esterano triaromático/ C 28, 20 R- esterano triaromático	Esterano	231
19/18	13 $\beta$ (H), 17 $\alpha$ (H), 20R - colestano/ 13 $\beta$ (H), 17 $\alpha$ (H), 20S - colestano	Esterano	217
65/67	24-etil-5 $\alpha$ (H), 14 $\alpha$ (H), 17 $\alpha$ , 20S- colestano/24-etil-5 $\alpha$ (H), 14 $\alpha$ (H), 17 $\alpha$ , 20R- colestano	Esterano	217
38/42	C15H28-sesquiterpeno/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
41/42	C15H28-sesquiterpeno/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123

43/42	C15H28-sesquiterpeno/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
44/42	C16H30-8b(H)-homodrimane/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
25/ (65+67)	24-etil-5 $\alpha$ (H), 14 $\beta$ (H), 17 $\beta$ , 20R- colestano/ (24-etil-5 $\alpha$ (H), 14 $\alpha$ (H), 17 $\alpha$ , 20S- colestano + 24-etil-5 $\alpha$ (H), 14 $\alpha$ (H), 17 $\alpha$ , 20R- colestano)	Esterano	218- 217
20/25	5 $\alpha$ (H), 14 $\beta$ (H), 17 $\beta$ (H), 20R- colestano/ 24-etil-5 $\alpha$ (H), 14 $\beta$ (H), 17 $\beta$ , 20R- colestano	Esterano	218
<b>Hidrocarburos poliaromáticos</b>			
7/8	2-metilfenantreno/1-metilfenantreno	Fenantreno	192
47/8	Metil antraceno/1-metilfenantreno	Fenantreno/ Antraceno	192
5/6	4-metildibenzotiofeno/1- metildibenzotiofeno	Dibenzotiofeno	198
48/50	C2 Dibenzotiofenos/ C2 Fenantrenos antracenos	Dibenzotiofeno/ Fenantreno antraceno	212- 206
51/52	C3 Dibenzotiofenos/ C3 Fenantrenos antracenos	Dibenzotiofeno/ Fenantreno antraceno	226- 220
11/53	Reteno/C4 Fenantrenos	Reteno/ Fenantreno	234
11/16	Reteno/ Metil fenantreno	Reteno/ Fenantreno	234
17/16	Benzonaftotiofeno/ Tetrametil fenantreno	Benzotiofeno/ Fenantreno	234
9/14	<b>Metilfluoranteno/4-metilpireno</b>	Flouranteno/ Pireno	216
10/14	<b>Benzofluoreno/4-metilpireno</b>	Fluoreno/Pireno	216
13/14	<b>2-metilpireno/ 4-metilpireno</b>	Pireno	216
15/14	<b>1-metilpireno/ 4-metilpireno</b>	Pireno	216
54/49	C23 terpeno tricíclico /C2- fenantreno/antraceno	Terpeno/ Fenantreno Antraceno	191- 192

A partir de esta información se calcularon todas las relaciones de diagnóstico de las muestras. Se puede utilizar muchas relaciones de diagnóstico en la identificación de derrames de petróleo, debido a la gran cantidad de diferentes distribuciones de compuestos que presenta el petróleo y sus derivados<sup>56</sup>.

En el Cuadro XV se muestran algunas aplicaciones que han tenido las diferentes relaciones de diagnóstico para los HAP<sup>57</sup>.

**Cuadro XV.** Algunas aplicaciones de las relaciones de diagnóstico para los HAP<sup>57</sup>.

<b>Relación de diagnóstico</b>	<b>Aplicación</b>
C2-dibenzotiofeno/C2-fenantreno vs. C3-dibenzotiofeno/C3-fenantreno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distingue entre fuentes con composición química similar.</li> <li>- Usado en el establecimiento de modelos estadísticos para la asignación de fuentes</li> </ul>
C3-dibenzotiofeno/C3-fenantreno vs. C3-dibenzotiofeno/C3-criseno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distingue la cantidad de envejecimiento de petróleo.</li> <li>- Distingue el derrame de petróleo de otras fuentes.</li> </ul>
4 a 6 anillos no alquilados PAH/ $\Sigma$ PAH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Usado para la identificación de varias fuentes, se utilizó en el estudio de contaminación de hidrocarburos en el Península Ártica.</li> </ul>
Relaciones de 3-DBT Isómeros	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Usado en la identificación de fuentes desconocidas de petróleo.</li> <li>- Distingue entre petróleo con composición química similar</li> <li>- Distingue entre petróleo con envejecimiento físico y biodegradación</li> <li>- Es un indicador de biodegradación</li> </ul>
Crisenos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es un indicador de envejecimiento</li> </ul>

En el caso de la metodología CEN/TR 15522-2, se utilizan las relaciones establecidas en el Cuadro XIV. Respecto a los PAH las relaciones más utilizadas son las de los compuestos dibenzotiofenos y fenantrenos, además de las que involucran pirenos, fluorantenos y benzofluorenos, en total son 15 relaciones de diagnóstico recomendados, derivados de los PAH (iones: 212, 220, 230, 192, 234,

226, 242) <sup>1</sup>. En el método implementado se utilizan para el cálculo de las relaciones de diagnóstico los dibenzotiofenos, los fenantrenos, los pirenos, los fluorantenos y los benzofluorenos, además del reteno. Estos compuestos se monitorean a través de los fragmentos de iones 191, 192, 198, 212, 206, 216, 220, 226 y 234.

Entre los biomarcadores más utilizados que se han identificado y se usan en la caracterización del petróleo y sus derivados, se incluyen los terpenos (ion 191), hopanos (ion 205), esteranos (ion 217/218), metil esteranos (ion 217/231) y los diaesterano (ion 217/259), estos biomarcadores son usados debido a su especificidad, diversidad y resistencia a la biodegradación y los procesos de envejecimiento<sup>1,57</sup>. En el caso de este método se trabaja, como se puede observar en el Cuadro XIV, con esteranos, metil esteranos, diesteranos y terpenos.

Dentro de la clase de los terpenoides cobran importancia los sesquiterpenos. En los derivados de petróleo ligeros o medios, como el combustible para aviones y el diésel, los procesos de refinación eliminan la mayoría de los esteratos tetracíclicos de alto peso molecular y triterpanos pentacíclicos, lo cual ayuda a que los sesquiterpanos bicíclicos de bajo peso molecular se concentren, en CG-MS estos compuestos pueden verse en los fragmentos de iones 123, 179, 193 y 207; se debe tener precaución al utilizarlos en el cálculo de relaciones de diagnóstico debido a que son afectados por los procesos de envejecimiento, principalmente la evaporación<sup>1</sup>. En el método implementado se trabaja con los sesquiterpenos y se monitorean en los fragmentos del ion 123.

Los biomarcadores son históricamente usados en la geoquímica del petróleo en la caracterización en términos de fuente, familia genética, migración y propiedades de maduración. El análisis químico de las características de la fuente y persistencia ambiental de los biomarcadores brinda información de relevancia en la determinación de la fuente de un derrame de petróleo, diferenciación entre petróleo, monitoreo del proceso de degradación y estado del proceso de envejecimiento<sup>57</sup>.

En resumen la razón principal por la que se eligen estas relaciones de diagnóstico de los HPA y los biomarcadores es debido a que los compuestos

utilizados son poco afectados por los procesos de envejecimiento, además de que son compuestos característicos del petróleo y sus derivados<sup>1</sup>.

### **3.7. Verificación del método.**

Se realizó como parte de la implementación del método un análisis de muestras ciegas. Se partió de dos tipos de búnker y se prepararon muestras ciegas en el laboratorio. Se le dio el tratamiento adecuado a cada una de las muestras identificadas con las letras de la A a la F y posteriormente se inyectó en el CG-MS utilizando el método implementado y validado. Como ya se mencionó el análisis de los datos se llevó a cabo basándose en lo estipulado en la norma CEN/TR 15522-2.

La comparación visual de cada uno de los cromatogramas y de las relaciones de diagnóstico permitió identificar las seis muestras. Como resultado se obtuvo que las muestras detalladas como A, B y E corresponden a una misma fuente de búnker y que las muestras identificadas como C, D y F proceden de un mismo búnker.

La directora del proyecto, quien preparó las muestras ciegas, confirmó la correcta identificación de las muestras.

Con esto se demuestra que el método cumple con el uso previsto y que su utilización es adecuada para la obtención de la huella digital en muestras de búnker y que mediante las relaciones de diagnóstico calculadas se logra el objetivo principal del método.

En la siguiente sección se utilizan los datos obtenidos para las muestras identificadas como B, C y E para explicar los cálculos efectuados.

### **3.8. Cromatogramas obtenidos para las muestras ciegas preparadas: Comparación visual.**

Una etapa inicial en la comparación de las muestras, es una inspección visual de los cromatogramas. Si se observan diferencias significativas no se procede con el análisis mediante relaciones de diagnóstico. En las siguientes figuras se muestra

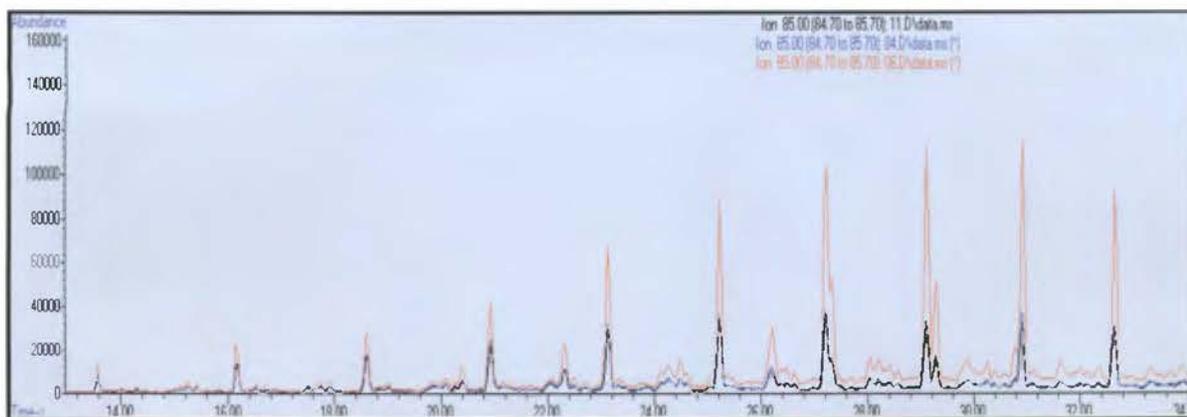
como ejemplo algunos de los cromatogramas de iones para las muestras identificadas como B, C y E utilizadas como muestras ciegas en la verificación.

Con el fin de identificar los compuestos es que se trabaja con los espectros de masas producidos de CG-MS, en este caso, una vez que los compuestos o grupos de compuestos son separados en la columna capilar del cromatógrafo de gases, ingresan al sistema de detección de masas en el cual son bombardeados por una fuente de electrones a una energía de 70 eV con el fin de fragmentarlos y trabajar con partes de los compuestos que sean más estables. Los fragmentos más estables son separados en el cuadrupolo, mientras que los aportan ruido a los cromatogramas son desviados y no llegan al detector.

Es de suma importancia el desarrollo del método SIM que se muestra en el Cuadro VI, ya que permite refinar la detección de solamente los fragmentos de los grupos de compuestos específicos que ayudan al establecimiento de relaciones de diagnóstico. En este Cuadro VI se muestra que iones se aíslan (iones objetivo) en intervalos para el tiempo total de la separación. Con la utilización de diferentes softwares es posible obtener un cromatograma de solo los iones objetivos utilizados y así obtener resultados más selectivos.

Por ejemplo, para la distribución de alcanos se trabaja con el ion 85, fragmento característico de los alcanos producido al impactar con un flujo de electrones a una energía específica los componentes que salen del cromatógrafo de gases en un tiempo definido.

En la Figura 34 se puede observar el cromatograma para el ion 85, correspondiente a los compuestos que presentan el fragmento de masa 85 a lo largo de toda la corrida cromatográfica de acuerdo al método SIM desarrollado.



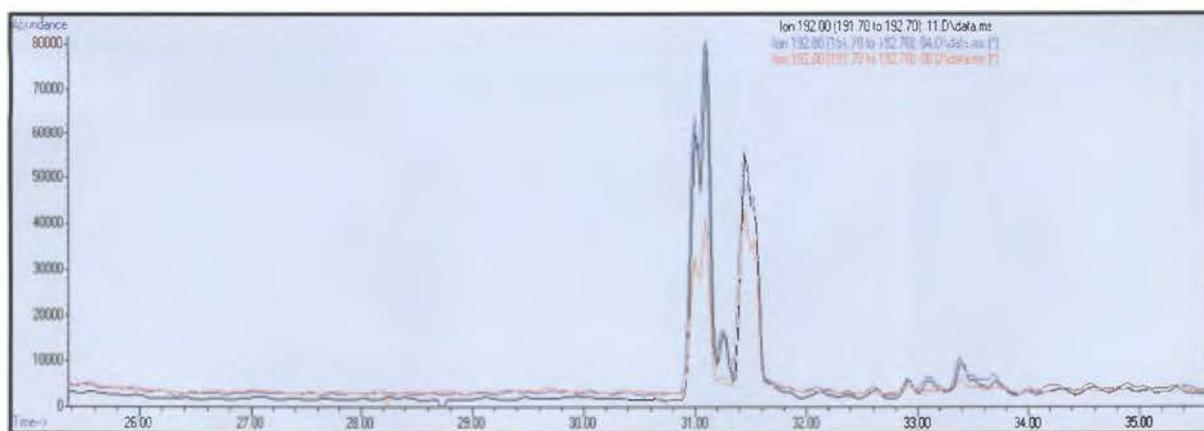
**Figura 34.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 85.

De la Figura 34 se puede observar como las tres muestras presentan una distribución de alcanos similar, en los tres casos se presentan las mismas señales cromatográficas al mismo tiempo de retención, lo cual implica que para el ion 85 las tres tienen los mismos componentes. En el búnker se puede encontrar de acuerdo al Cuadro III entre un 20 % y un 40% de alcanos por lo que es de esperar que las tres muestras presenten esta similitud.

De acuerdo con la teoría que indica que todos los petróleos y sus derivados van a presentar características que los diferencian de acuerdo a distribución y abundancia relativa de los componentes en base a su período y sitio de formación<sup>57</sup>, se puede observar en el cromatograma como para las muestras B y E existe una mayor similitud al compararlos con la muestra identificada como C, esto puede implicar que las muestras B y E se muestrearon tiempo después de entrar en contacto con agentes ambientales por lo que fueron afectadas por procesos de envejecimiento y se redujo la cantidad de alcanos o que las muestras B y E presentan un origen distinto al de la muestra C.

Otro de los iones con los que se trabaja es el 192, este ion corresponde al fenantreno, compuesto del grupo de los hidrocarburos poliaromáticos. En el Cuadro

III se puede observar como los HPA se encuentran presentes en el búnker en un intervalo de 1 % a 5 %.



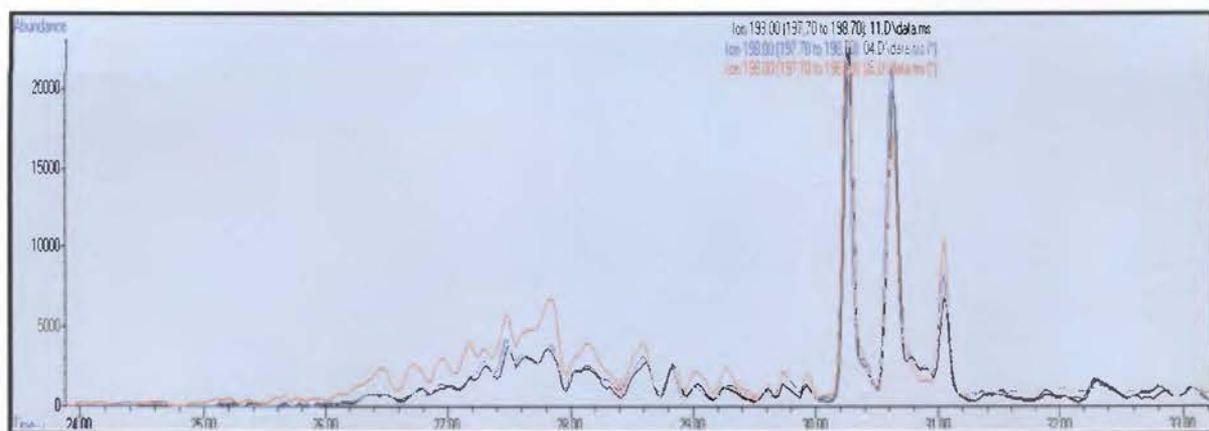
**Figura 35.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 192.

De la Figura 35 se puede observar como la diferencia en la abundancia relativa de los componentes es menos marcada respecto a la abundancia relativa en el caso del ion 85. Una observación importante de realizar es que en este caso la abundancia en las muestras B y E es mayor que en la muestra identificada como C, caso contrario al caso del ion 85.

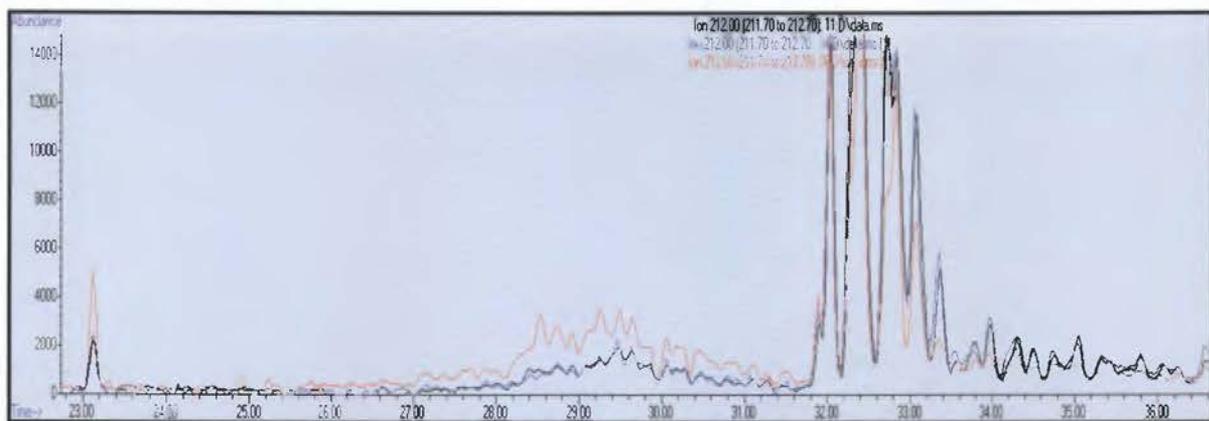
Se reporta en la literatura que en casos de derrames de petróleo las abundancias relativas de este tipo de compuestos se mantienen a lo largo del tiempo, debido a que son muy estables y poco solubles en agua, esto implica que los procesos de envejecimiento no los afectan o los afectan en un porcentaje muy bajo<sup>53</sup>. Esta razón los convierte en compuestos importantes en la determinación de la huella digital del búnker en este estudio.

Otros de los iones que se pueden analizar en el estudio de huella digital del búnker son el 198 y 212, correspondientes a los dibenzotiofenos, compuestos aromáticos que presentan azufre. Estos suelen eluir de la columna en el intervalo

de tiempo de los compuestos con 18 y 21 carbonos. En la Figura 36 y la Figura 37 se muestran los cromatogramas para estos iones.



**Figura 36.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 198.



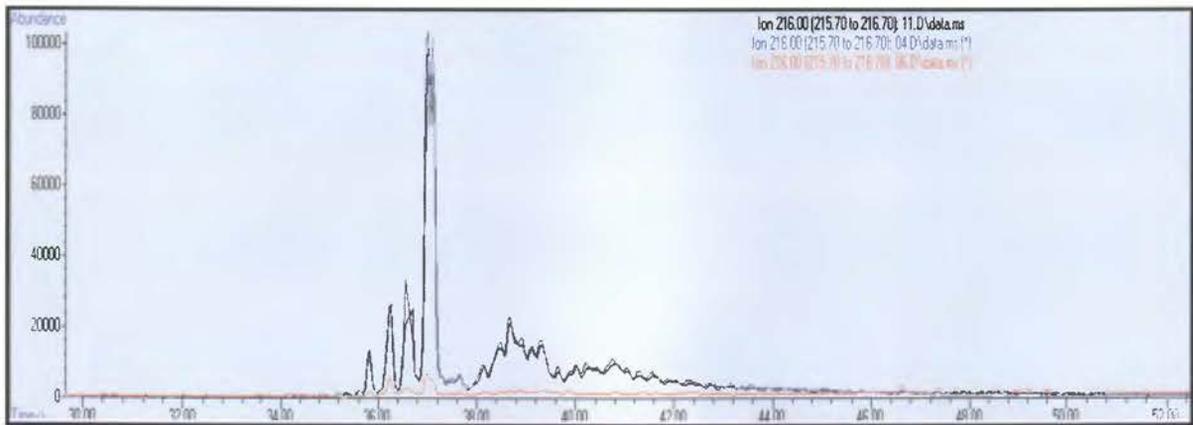
**Figura 37.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 212.

De estos cromatogramas es posible ver la gran similitud en abundancia relativa de los componentes. Algunos de los hidrocarburos son degradados ya sea por fotooxidación o por bacterias ya sea en un medio aerobio o en un medio anaerobio. Las bacterias anaerobias son las que degradan principalmente los

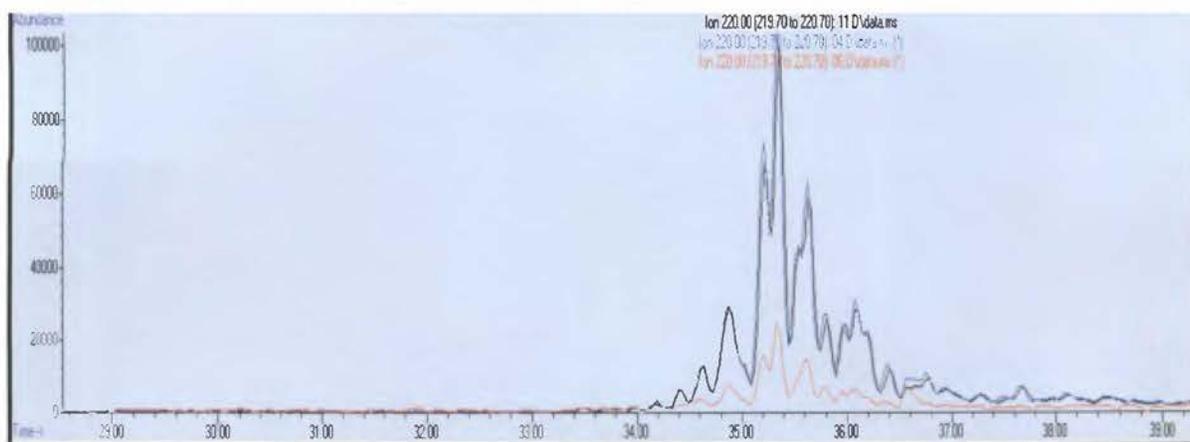
componentes azufrados<sup>53</sup>. En el búnker es importante ya que la presencia de componentes azufrados es de 2 % a 4 %, tal y como se muestra en el Cuadro III.

En este caso no se evidencia la degradación debido a que las muestras no entraron en contacto con este tipo de bacterias. Si los procesos de envejecimiento cobraran importancia se podría observar una disminución de las abundancias relativas al realizar el análisis de la misma muestra en diferentes días de exposición.

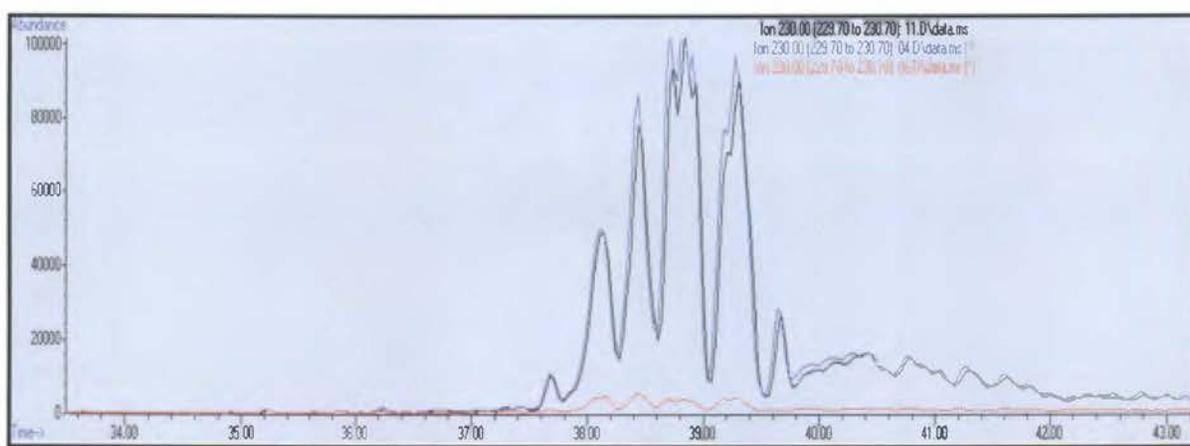
En la Figura 38, Figura 39, Figura 40, Figura 41 y Figura 42 se muestran los cromatogramas para los iones 216, 220, 230, 231 y 234, que corresponden a compuestos como el fluoranteno, pireno, fenantreno, esteranos triaromáticos y reteno, los cuales se clasifican también como hidrocarburos poliaromáticos.



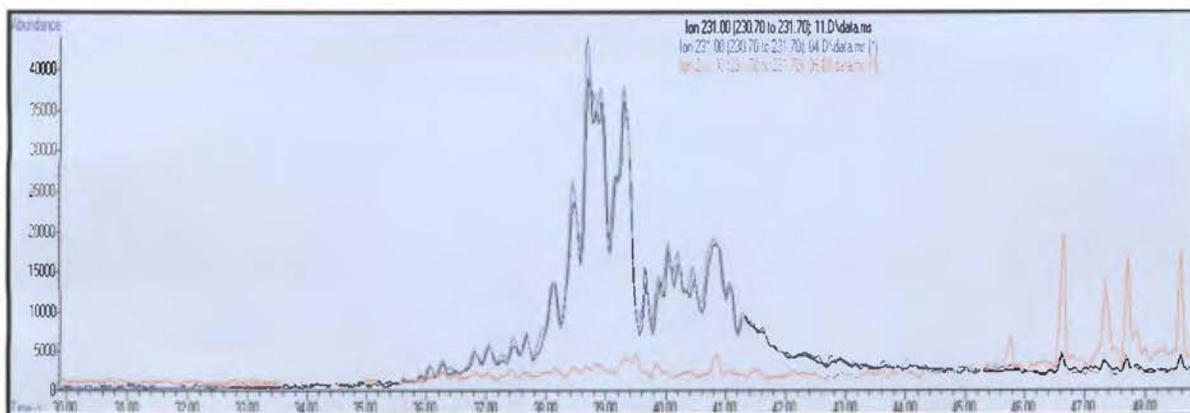
**Figura 38.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 216.



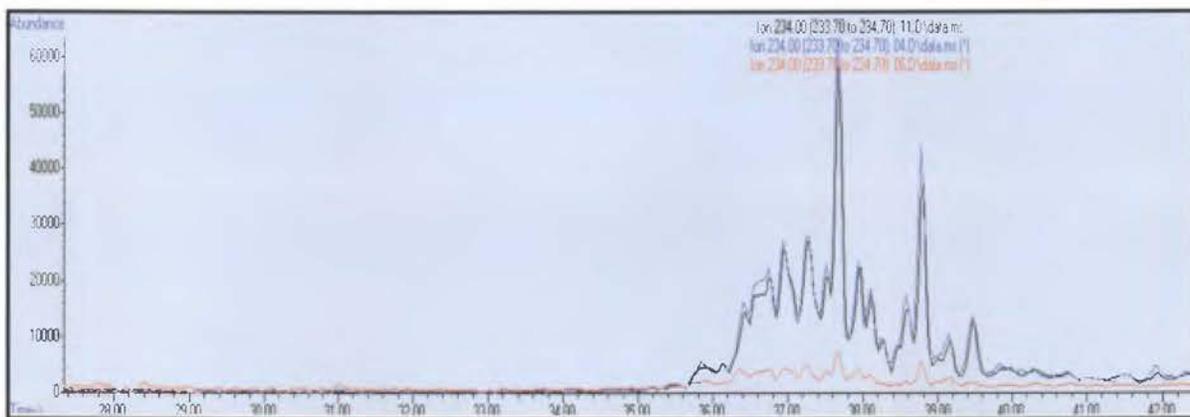
**Figura 39.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 220.



**Figura 40.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 230.



**Figura 41.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 231.



**Figura 42.** Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para el ion 234.

De los iones 216, 220, 230 y 234 se puede observar como los componentes para la muestra identificada como C se encuentran con una abundancia relativa menor que en las muestras B y E. Para el caso del ion 231 se puede observar como para unos compuestos la abundancia relativa es mayor en las muestras B y E, mientras que para otros componentes es mayor en la muestra C.

En general, los HPA con un mayor número de anillos aromáticos tienen una mayor estabilidad y una menor evaporación además de una baja solubilidad en

agua, estos compuestos son muy útiles en el estudio de la huella digital debido a la poca afectación que tienen hacia los procesos de envejecimiento.

De todos los cromatogramas de iones se puede observar como los diferentes búnkers analizados presentan mucha similitud en cuanto a los compuestos que presentan, sin embargo, las abundancias relativas de estos compuestos difieren, esto se puede explicar por procesos de envejecimiento que afecten los compuestos o por el origen de los búnkers analizados. Por lo tanto, ya que las muestras B y E tienen un cromatograma de iones similar y que la muestra identificada como C muestra un comportamiento diferente, se debe proceder al cálculo de las relaciones de diagnóstico para las muestras B y E.

## Capítulo 4: Cálculos

Para facilitar el manejo de los datos obtenidos a raíz del análisis de los cromatogramas se confeccionó una hoja de cálculo, esta se validó realizando los cálculos de las relaciones de diagnóstico y coeficientes de variación con la hoja de cálculo y manualmente.

#### **4.1. Cálculos.**

Con base en los cromatogramas mostrados en la Sección 3.5 se procedió a la integración manual de cada cromatograma obtenido para diferentes muestras. La región marcada con rojo en dichos cromatogramas corresponde al área integrada para cada compuesto o grupo de compuestos. Con estas áreas se procedió a calcular las relaciones de diagnóstico mostradas en el Cuadro XIV.

A continuación, se va a desarrollar una muestra de cálculo para una de las muestras analizadas durante la validación y la verificación.

##### **4.1.1. Áreas obtenidas.**

En el Cuadro XVI se muestran las áreas obtenidas para las réplicas de inyección de la muestra. Estas áreas se obtuvieron con el programa computacional ChemStation (versión E.02.00.493) de Agilent, que es el software con el que cuenta el equipo de CG-MS.

**Cuadro XVI.** Áreas obtenidas para la muestra identificada como B.

Ion	Referencia	Grupo	Área
212	48	C2 Dibenzotiofenos	7764484
226	51	C3 Dibenzotiofenos	10414296
206	50	C2 Fenantrenos antracenos	27895187
220	52	C3 Fenantrenos antracenos	34247737
230	56	C2 Fluorenos pirenos	53421955
242	60	C1 crisenos	37272553
192	7	2MP	8209245
	47	MA	1043343
	8	1MP	5350760
	49	Pico más alto	6846837
198	5	4-MDBT	1257321
	6	1-MDBT	440904
85	1	C17	2207937
	2	Pristano	801250
	3	C18	2262539
	4	Fitano	1178449
192	53	C4 Fenantrenos	25114782
234	11	Reteno	1660857
	16	Tetrametil fenantreno	4724523
	17	BNT	3113036
216	9	2-MFL	969307
	10	BaF	2356351
	12	Benzofluoreno	3703400
	13	2-MPy	3703400
	14	4-Mpy	13994281
	15	1-MPy	13994281
123	38	Ses 1	229610
	41	Ses 2	142710
	42	Ses 3	251697
	43	Ses 4	232307
	44	Ses 8	345887
218	20	27 bbR + 27bbS	226321
	63	28 bbS + 28 bbR	258287
	25	29 bbS + 29 bbR	230362
231	57	C20 TA	1455890
	59	C21TA	1444309
	22	SC 26 TA	154967
	24	RC26 TA + SC27 TA	419079
	27	SC28 TA	560635
	29	RC27 TA	287050
	32	RC28 TA	460687

#### 4.1.2. Cálculo de relaciones de diagnóstico.

A partir de las áreas mostradas en el Cuadro XVI se procedió a calcular las relaciones de diagnóstico.

Este cálculo se efectuó de la siguiente manera.

$$\text{Relación de diagnóstico} = \frac{5}{6} = \frac{1257321}{440904} = 2.9$$

De esta misma manera se calculó cada una de las siguientes relaciones de diagnóstico, las mismas se muestran en el Cuadro XVII.

**Cuadro XVII.** Relaciones de diagnóstico para la muestra ciega B.

Relación de diagnóstico			
Relación	Valor	Relación	Valor
1/2	2.8	29/24	0.7
3/4	1.9	32/24	1.1
2/4	0.7	38/42	0.9
5/6	2.9	41/42	0.6
7/8	1.5	43/42	0.9
9/14	0.1	44/42	1.4
10/14	0.2	47/8	0.2
12/14	0.3	48/50	0.3
13/14	0.3	51/52	0.3
15/14	1.0	57/59	1.0
11/16	0.4	59/24	3.4
17/16	0.7	11/53	0.1
20/25	1.0	59/32	3.1
22/24	0.4	22/27	0.3
27/24	1.3	29/32	0.6

Esta muestra se analizó por duplicado, se realizó el mismo tratamiento para calcular las relaciones de diagnóstico de la réplica y con estos valores se calculó un coeficiente de variación entre réplicas, este mismo según la repetibilidad del método

debía ser igual o menor a 5 %. En el Cuadro XVIII se muestran los valores del coeficiente de variación. Para calcular el coeficiente de variación se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio de los datos}} * 100$$

**Cuadro XVIII.** Coeficientes de variación entre las réplicas para las relaciones de diagnóstico de la muestra B.

Relación de diagnóstico			
Relación	CV	Relación	CV
1/2	3.0	29/24	1.0
3/4	2.7	32/24	1.9
2/4	1.1	38/42	0.5
5/6	2.8	41/42	2.7
7/8	2.1	43/42	3.2
9/14	0.0	44/42	3.4
10/14	1.6	47/8	1.7
12/14	0.9	48/50	2.9
13/14	0.9	51/52	0.3
15/14	0.0	57/59	2.0
11/16	1.5	59/24	3.5
17/16	0.3	11/53	3.3
20/25	4.0	59/32	1.7
22/24	4.4	22/27	2.0
27/24	2.4	29/32	0.9

Con estos resultados se demostró que el efecto ocasionado por la repetibilidad del método no era importante en los resultados finales.

#### **4.1.3. Cálculo de coeficientes de variación para comparar la muestra B con la muestra E.**

Se realizó el mismo cálculo anterior para la muestra identificada como E. Una vez obtenidas las relaciones de diagnóstico para cada señal, se procedió a calcular los coeficientes de variación entre cada misma relación para la muestra B y la muestra E. Este CV debe ser igual o menor al 14 % según se establece en la norma europea.

Este valor (14 %) debido a que se trabaja con muestras reales y no con un coctel de alcanos como en las pruebas de validación, en estas muestras se espera que los procesos de envejecimiento tomen mayor importancia por lo que se permite una variación mayor.

Además, al trabajar con muestras reales se espera que la variación entre muestras sea mayor a lo que fue con los alcanos, producto de la gran variabilidad de la composición de las mismas, esta gran variabilidad es la que adiciona un paso previo de purificación.

**Cuadro XIX.** Datos del cálculo del coeficiente de variación al comprar la muestra B con la muestra E.

Relación de diagnóstico	CV	Relación de diagnóstico	CV
1/2	1.4	38/42	7.7
3/4	12.9	41/42	8.4
2/4	3.4	43/42	5.4
5/6	5.6	44/42	0.4
7/8	9.1	47/8	1.5
9/14	0.7	48/50	0.2
10/14	3.0	51/52	0.3
12/14	2.8	57/59	1.5
13/14	2.8	59/24	3.0
15/14	0.0	11/53	6.6
11/16	11.1	59/32	0.3
17/16	2.7	22/27	11.0
22/24	3.3	29/32	8.4
27/24	7.7		
29/24	11.8		
32/24	3.3		

A partir de los datos anteriores se obtiene que ambas muestras corresponden a la misma, esto motivado por el hecho de que al comparar las relaciones de diagnóstico se obtienen coeficientes de variación inferiores al 14 %.

Estos mismos cálculos se efectuaron al utilizar una hoja de cálculo diseñada para una manipulación más sencilla de los datos, obteniendo los mismos resultados. Por lo tanto, se valida así dicha hoja de cálculo y cumple con su uso.

En el Anexo 2 se muestran imágenes de dicha hoja de cálculo y un pequeño esquema para su utilización.

## Capítulo 5: Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos en la realización de este proyecto final se puede concluir lo siguiente:

- 1) Se logró implementar el método de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas en el Centro de Electroquímica y Energía Química de la Universidad de Costa Rica, se validaron los parámetros de linealidad, precisión y repetibilidad instrumental. Basándose en los resultados se concluye que el método es adecuado según el uso previsto, por lo cual la optimización e implementación del mismo se llevaron a cabo con éxito.
- 2) La modificación más importante a la metodología fue el cambio en la rampa final de temperatura en la separación cromatográfica, debido a limitaciones del equipo utilizado. Se logró optimizar esta rampa al obtener una buena separación de los picos de interés a tiempos de retención en los cuales no se podía aplicar el cambio de temperatura del método original.
- 3) Debido a la gran cantidad de datos que se obtienen del análisis de huella digital, se realizó y validó la hoja de cálculo, con la cual se logró procesar la información obtenida de manera más eficaz y confiable.
- 4) Se probó el método implementado y validado al analizar muestras reales. Con los resultados obtenidos se concluye que el método cumple su función ya que se logró identificar con su utilización correctamente todas las muestras.
- 5) La metodología europea está desarrollada para productos de petróleo. Se demostró que esta metodología es muy versátil ya que su utilización con búnker da resultados correctos a la hora de la determinación de la huella digital.

## Referencias

- (1) Comité Europeo de Normalización. Oil spill identification — Waterborne petroleum and petroleum products — Part 2: Analytical methodology and interpretation of results based on GC-FID and GC-MS low resolution analyses. Comité Europeo de Normalización 2009, p 136.
- (2) Vargas Fallas, L. C. Remediación del derrame de hidrocarburos en el caso Barreal-Belén, Costa Rica. *Tecnol. en marcha* **2009**, 22 (4), 3-17.
- (3) Prieto Díaz, V.; Martínez de Villa Pérez, A. LA CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS POR HIDROCARBUROS: *Rev. Cuba. Hig. Epidemiol* **1999**, 37 (1), 13-20.
- (4) González, J. J.; Viñas, L.; Franco, M. A.; Fumega, J.; Soriano, J. A.; Grueiro, G.; Muniategui, S.; López-Mahía, P.; Prada, D.; Bayona, J. M.; et al. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* **2006**, 53 (5-7), 250-259.
- (5) Ismail, A.; Ekhwan, M.; Kassim, A.; Zain, S.; Mokhtar, M.; Ayub, M. Chemometric techniques in oil classification from oil spill fingerprinting. **2016**, 111, 339-346.
- (6) Onojake, M. C.; Anyanwu, C. O.; Iwuoha, G. N. Chemical fingerprinting and diagnostic ratios of Agbada-1 oil spill impacted sites in Niger Delta, Nigeria. *Egypt. J. Pet.* **2015**, 25 (4), 465-471.
- (7) Douglas, G. S.; Stout, S. A.; Uhler, A. D.; McCarthy, K. J.; Emsbo-mattingly, S. D. *Advantages of quantitative chemical fingerprinting in oil spill identification and allocation of mixed hydrocarbon contaminants*, Second Ed.; Elsevier Inc., 2016.
- (8) Albaigés, J.; Bayona, J. M.; Radović, J. R. *20 – Photochemical effects on oil spill fingerprinting*; 2016.
- (9) *Environmental Forensics Contaminant Specific Guide*; Morrison, R., Murphy, B., Eds.; Elsevier Inc.: Estados Unidos, 2006.

- (10) Albaigés, J. *CONTAMINACIÓN POR VERTIDOS DE HIDROCARBUROS AL MEDIO MARINO*; Barcelona.
- (11) Albaigés, J.; Gonzáles, J. J. *IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VERTIDOS DE HIDROCARBUROS AL MEDIO MARINO*. 2007.
- (12) Wan, Y.; Wang, B.; Khim, J. S.; Hong, S.; Shim, W. J.; Hu, J. Naphthenic acids in coastal sediments after the Hebei spirit oil spill: A potential indicator for oil contamination. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (7), 4153-4162.
- (13) Valentine, D. L.; Fisher, G. B.; Bagby, S. C.; Nelson, R. K.; Reddy, C. M.; Sylva, S. P.; Woo, M. A. Fallout plume of submerged oil from Deepwater Horizon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (45), 15906-15911.
- (14) Navas, J. M.; Babín, M.; Casado, S.; Fernández, C.; Tarazona, J. V. The Prestige oil spill: A laboratory study about the toxicity of the water-soluble fraction of the fuel oil. *Mar. Environ. Res.* **2006**, *62*, S352-s355.
- (15) Itopf. *Fate of marine oil spills*; Technical Information Paper; 2002.
- (16) Kingston, P. F. Long-term environmental impact of oil spills. *Spill Sci. Technol. Bull.* **2002**, *7* (1-2), 53-61.
- (17) Prince, R. C.; Garrett, R. M.; Bare, R. E.; Grossman, M. J.; Townsend, T.; Sufflita, J. M.; Lee, K.; Owens, E. H.; Sergy, G. a.; Braddock, J. F.; et al. The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Sci. Technol. Bull.* **2003**, *8* (2), 145-156.
- (18) Venosa, A. D.; Zhu, X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Sci. Technol. Bull.* **2003**, *8* (2), 163-178.
- (19) Yim, U. H.; Ha, S. Y.; An, J. G.; Won, J. H.; Han, G. M.; Hong, S. H.; Kim, M.; Jung, J. H.; Shim, W. J. Fingerprint and weathering characteristics of stranded oils after the Hebei Spirit oil spill. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *197*, 60-69.

- (20) National Oceanic and Atmospheric Administration. Weathering Processes Affecting Crude Blend Spills <http://www.noaa.gov/>.
- (21) Asif, M.; Grice, K.; Fazeelat, T. Assessment of petroleum biodegradation using stable hydrogen isotopes of individual saturated hydrocarbon and polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in oils from the Upper Indus Basin, Pakistan. *Org. Geochem.* **2009**, *40* (3), 301-311.
- (22) Ketkar, K. W. The Oil Pollution Act of 1990 : A Decade Later. *Spill Sci. Technol. Bull.* **2002**, *7* (2), 45-52.
- (23) Office of Response and Restoration. Fingerprinting Oil <http://response.restoration.noaa.gov/oil-and-chemical-spills/oil-spills/resources/fingerprinting-oil.html>.
- (24) Yang, C.; Brown, C. E.; Hollebone, B.; Yang, Z.; Lambert, P.; Fieldhouse, B.; Landriault, M.; Wang, Z. *Chemical Fingerprints of Crude Oils and Petroleum Products*; Elsevier Inc., 2017.
- (25) Wang, Z.; Stout, S. Chemical Fingerprinting of Spilled or Discharged Petroleum- Methods and Factors Affecting Petroleum Fingerprints in the Environment. En *Oil spill Environmental Forensics*; Elsevier Inc.: California, 2007; pp 1-45.
- (26) Wang, Z.; Fingas, M.; Yang, C.; Christensen, J. H. Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. En *Environmental forensics: contaminant specific guide.*; Academic Press, Incorporated., 2006; pp 340-404.
- (27) Wang, Z.; Yang, C.; Fingas, M.; Hollebone, B.; Hyuk Yim, U.; Ryoung Oh, J. *4 - Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification BT - Oil Spill Environmental Forensics*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2016.
- (28) Bayona, J. M.; Domínguez, C.; Albaigés, J. Analytical developments for oil spill fingerprinting. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2015**, *5*, 26-34.
- (29) Boehm, P. D.; Douglas, G. S.; Burns, W. a.; Mankiewicz, P. J.; Page, D. S.;

- Bence, a. E. Application of petroleum hydrocarbon chemical fingerprinting and allocation techniques after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* **1997**, 34 (8), 599-613.
- (30) Christensen, J. H.; Tomasi, G. Practical aspects of chemometrics for oil spill fingerprinting. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1169 (1-2), 1-22.
- (31) Carls, M. G.; Holland, L.; Irvine, G. V.; Mann, D. H.; Lindeberg, M. Petroleum biomarkers as tracers of Exxon Valdez oil. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, 35 (11), 2683-2690.
- (32) Mulabagal, V.; Yin, F.; John, G. F.; Hayworth, J. S.; Clement, T. P. Chemical fingerprinting of petroleum biomarkers in Deepwater Horizon oil spill samples collected from Alabama shoreline. *Mar. Pollut. Bull.* **2013**, 70 (1-2), 147-154.
- (33) Barakat, A. O.; Mostafa, A. R.; Qian, Y.; Kennicutt, M. C. Application of petroleum hydrocarbon chemical fingerprinting in oil spill investigations - Gulf of Suez, Egypt. *Spill Sci. Technol. Bull.* **2002**, 7 (5-6), 229-239.
- (34) Franco, M. a.; Viñas, L.; Soriano, J. a.; de Armas, D.; González, J. J.; Beiras, R.; Salas, N.; Bayona, J. M.; Albaigés, J. Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the Prestige oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* **2006**, 53 (5-7), 260-271.
- (35) Boehm, P. D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs); pp 314-334.
- (36) Yang, C.; Wang, Z.; Liu, Y.; Yang, Z.; Li, Y.; Shah, K.; Zhang, G.; Landriault, M.; Hollebone, B.; Brown, C.; et al. Aromatic Steroids in Crude Oils and Petroleum Products and Their Applications in Forensic Oil Spill Identification. *Environ. Forensics* **2013**, 14 (4), 278-293.
- (37) Antle, P. M.; Zeigler, C. D.; Wilton, N. M.; Robbat, Jr., A. A more accurate analysis of alkylated PAH and PASH and its implications in environmental forensics. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2014**, 94 (4), 332-347.
- (38) Sandison, C. M.; Alexander, R.; Kagi, R. I. The analysis of polar fractions

from sediment extracts and crude oils using reaction-gas chromatography-mass spectrometry. *Org. Geochem.* **2003**, 34 (10), 1373-1389.

- (39) Christensen, J. H.; Hansen, A. B.; Tomasi, G.; Mortensen, J.; Andersen, O. Integrated methodology for forensic oil spill identification. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38 (10), 2912-2918.
- (40) Gross, J. H. *Mass Spectrometry*, 2.<sup>a</sup> ed.; Springer: Nwe York, 2011.
- (41) Pastor, D.; Sanchez, J.; Porte, C.; Albaigés, J. The Aegean Sea Oil Spill in the Galicia Coast ( NW Spain ). I . Distribution and Fate of the Crude Oil and Combustion Products in Subtidal Sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, 42 (10), 895-904.
- (42) Sutton, P. a.; Lewis, C. a.; Rowland, S. J. Isolation of individual hydrocarbons from the unresolved complex hydrocarbon mixture of a biodegraded crude oil using preparative capillary gas chromatography. *Org. Geochem.* **2005**, 36 (6), 963-970.
- (43) RECOPE. Datos Estadísticos Anuales de Importación y Exportación <https://www.recope.go.cr/negocios/comercio-internacional/estadisticas-de-importacion-y-exportacion/> (accessed feb 9, 2017).
- (44) Republica de Costa Rica. *Compendio de legislación ambiental*; 2010.
- (45) Uhler, A. D.; Stout, S. A.; Douglas, G. S.; Healey, E. M.; Emsbo-Mattingly, S. D. 13 - *Chemical character of marine heavy fuel oils and lubricants*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2016.
- (46) ASTM International. ASTM D396-15c: Standard Specification for Fuel Oils <http://compass.astm.org/download/D396.27803.pdf> (accessed jul 8, 2016).
- (47) Fray, E. Bunker (Combustible) <http://www.articuloz.com/negocios-articulos/bunker-combustible-491964.html>.
- (48) RECOPE. *Manual de productos*; 2011; Vol. 1.
- (49) INTECO. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de

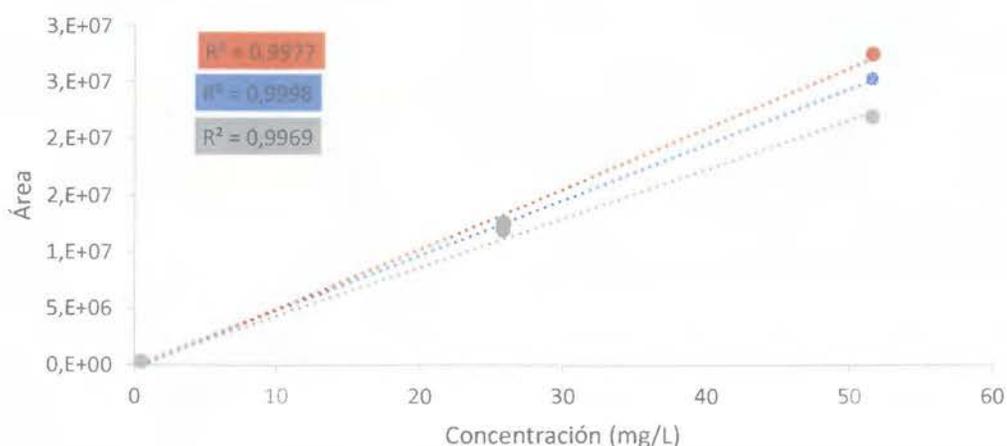
ensayo y de calibración . **2005**, N.º 506, 1-38.

- (50) Morillas P.P., E. E. y colaboradores. *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*; 2016.
- (51) EURACHEM. Eurachem - a quick reference  
<https://www.eurachem.org/index.php/mnu-about> (accessed ago 25, 2016).
- (52) Soares, M.; PRACAMS. Curso sobre Validación de Métodos Analíticos en Laboratorios de Ensayo. 2015.
- (53) Soriano-Sanz, J. A. CONTENIDO EN HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS ( PAHs ) EN MEJILLÓN SILVESTRE DE LA COSTA DE GALICIA Y CANTÁBRICO , ANTES Y DESPUÉS DEL VERTIDO DEL B / T PRESTIGE. **2009**, 323.
- (54) ASTM International. ASTM D5739-06: Standard Practice for Oil Spill Source Identification by Gas Chromatography and Positive Ion Electron Impact Low Resolution Mass.
- (55) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4.ª ed.; Pearson Educación S.A.: Madrid, 2002.
- (56) Wang, Z. Oil spill identification. *J. Chromatogr. A* **1999**, 843, 369-411.
- (57) Wang, Z.; Fingas, M. F. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Mar. Pollut. Bull.* **2003**, 47 (9-12), 423-452.
- (58) Daling, P. S.; Faksness, L. G.; Hansen, A. B.; Stout, S. A. Improved and standardized methodology for oil spill fingerprinting. *Environ. Forensics* **2002**, 3 (3-4), 263-278.

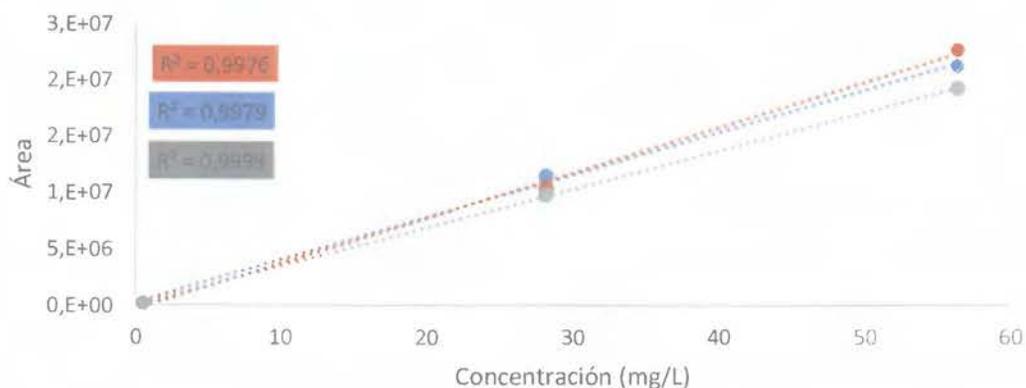
## Anexos

## Anexo 1. Datos para la validación de la linealidad, precisión.

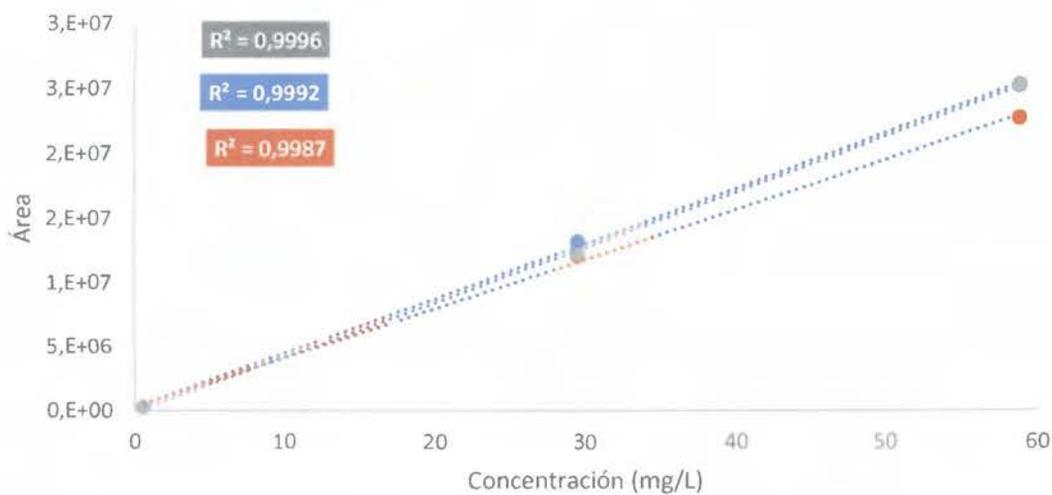
En la validación de la linealidad se realizó gráficos que muestran el comportamiento lineal de los compuestos utilizados. En las siguientes figuras se muestran dichos gráficos con los respectivos coeficientes de correlación. No se realiza un análisis de cada curva de calibración puesto que el método no implica la cuantificación de los componentes solo su comparación.



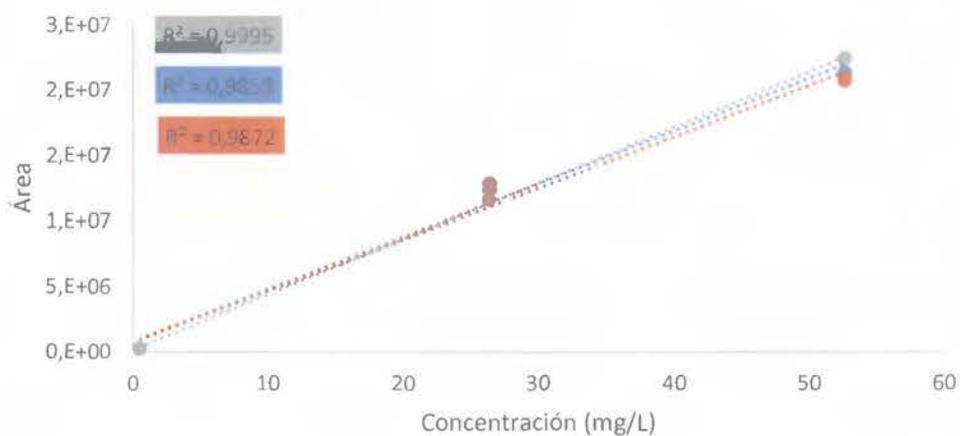
**Figura 43.** Curva de calibración obtenida para el nonadecano por GC-MS.



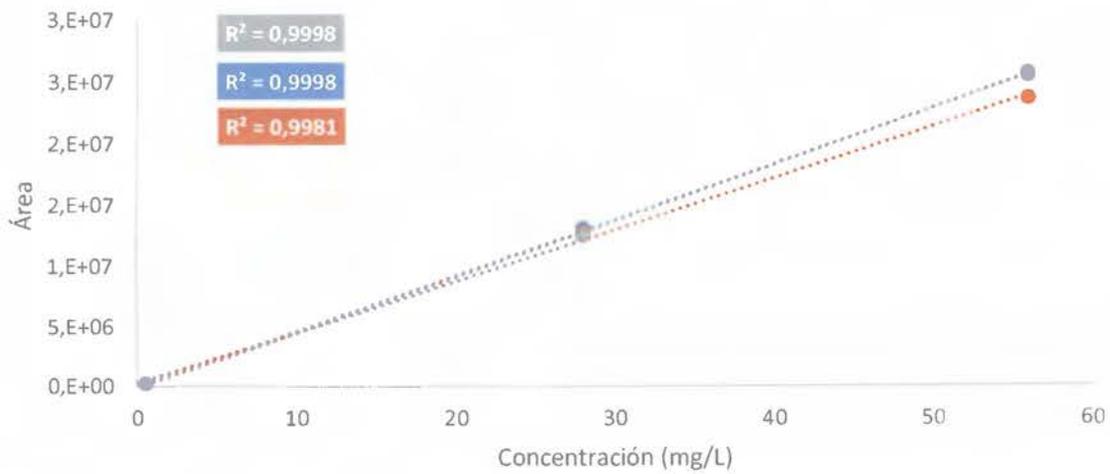
**Figura 44.** Curva de calibración obtenida para el eicosano por CG-MS.



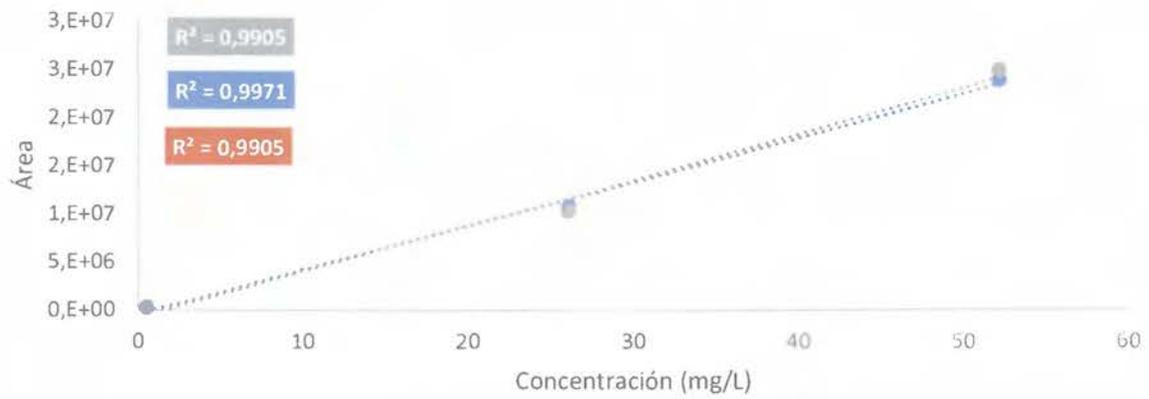
**Figura 45.** Curva de calibración obtenida para el heneicosano por CG-MS.



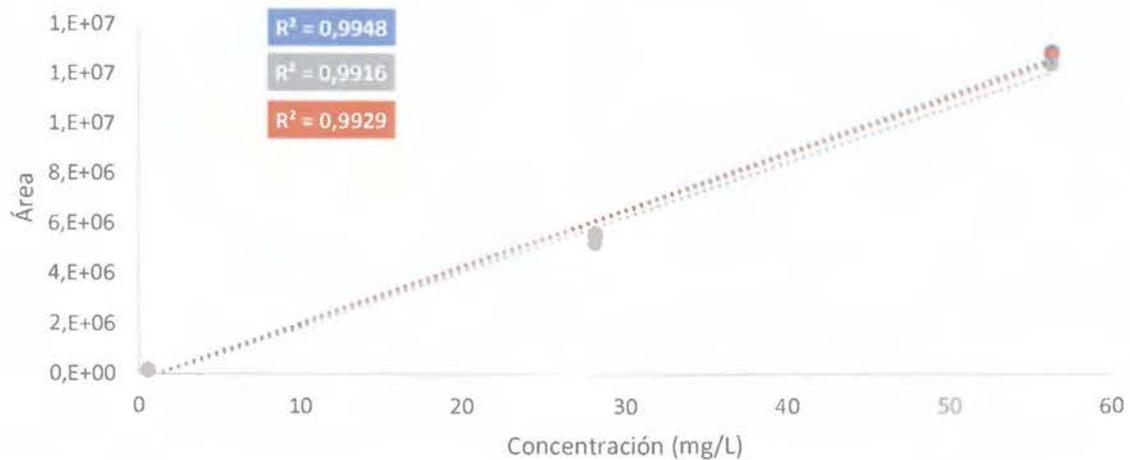
**Figura 46.** Curva de calibración obtenida para el tricosano por CG-MS.



**Figura 47.** Curva de calibración obtenida para el tetracosano por CG-MS.



**Figura 48.** Curva de calibración obtenida para el pentacosano por CG-MS.



**Figura 49.** Curva de calibración obtenida para el triacontano por CG-MS.

Para el análisis de la precisión se muestra en el Cuadro XX las áreas de las inyecciones de cada componente con las cuales se calculó el coeficiente de variación.

**Cuadro XX.** Datos utilizados en el cálculo de la precisión del método.

<b>Compuesto</b>	<b>Área</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Área</b>
<b>Nonadecano</b>	13551355	<b>Eicosano</b>	10947419
	12445343		11297665
	12925058		11342951
	12493746		11890784
	12110468		11458995
	12828810		11207886
	12135881		10250568
	12278716		10376678
<b>Heneicosano</b>	12985776	<b>Octacosano</b>	14042465
	12772678		14161002
	12366778		14057748
	12509822		13788397
	12407267		13523681
	11377908		12779178
	12164704		12739234
	12376659		12643562
<b>Tetracosano</b>	11056892	<b>Pentacosano</b>	11108340
	11583725		11106408
	12456119		10689297
	12038038		10985304
	11473898		11041006
	12589190		10107540
	12474564		10396148
<b>Tricosano</b>	12054513	<b>Triacotano</b>	5632750
	13036323		5584252
	13048631		5212202
	12823694		5158333
	11541816		5144748
	12144596		5238175
	12254531		5383824

## Anexo 2. Manejo de hoja de cálculo elaborada.

Una vez analizados los cromatogramas de iones para cada muestra se utiliza la siguiente hoja de cálculo, con el fin de manejar los datos de una manera más sencilla.

La hoja cuenta con un menú que permite acceder a diferentes pestañas en las cuales se coloca las áreas obtenidas para cada muestra y se puede observar los resultados desplegados con esas áreas.

La pantalla principal se muestra en la Figura 50. En esta pantalla se coloca la información de las muestras.



**Figura 50.** Menú de hoja de cálculo en el análisis de los datos obtenidos de los cromatogramas para el método de huella digital.

En la pestaña “Ingreso de áreas” se colocan todos los datos de las áreas de la posible fuente y de dos muestras para comparar cada una respecto a la identificada como fuente. Se coloca la información para los duplicados en cada caso, además de la información obtenida para un blanco de muestra. La pantalla que se despliega en esta pestaña se muestra en la Figura 51.

Menú	Muestra			Fuente			Muestra M1			Muestra M2			Muestra Blanco	
	Ion	Área 1	Área 2	Ion	Área 1	Área 2	Ion	Área 1	Área 2	Ion	Área 1	Área 2	Ion	Área 1
	212						212			212			212	
	226						226			226			226	
	206						206			206			206	
	220						220			220			220	
	230						230			230			230	
	242						242			242			242	
	192						192			192			192	
	198						198			198			198	
	85						85			85			85	
	234						234			234			234	
	216						216			216			216	

**Figura 51.** Pantalla que se despliega en la pestaña "Ingreso de áreas".

En las pestañas "Relaciones de diagnóstico" se muestra el análisis efectuado entre réplicas para la fuente y las muestras. En el caso de que alguna sea mayor al 5 % se debe verificar las integraciones de los picos. En caso de que un CV sea superior al establecido la casilla se torna de color rojo. En la Figura 52 se muestra la pantalla que se despliega en esta pestaña.

Menu	Muestra	Fuente	Muestra	M1	Muestra	M2
	<b>Relación de diagnóstico</b>		<b>Relación de diagnóstico</b>		<b>Relación de diagnóstico</b>	
	1/2	#iDIV/0!	1/2	#iDIV/0!	1/2	#iDIV/0!
	3/4	#iDIV/0!	3/4	#iDIV/0!	3/4	#iDIV/0!
	2/4	#iDIV/0!	2/4	#iDIV/0!	2/4	#iDIV/0!
	5/6	#iDIV/0!	5/6	#iDIV/0!	5/6	#iDIV/0!
	7/8	#iDIV/0!	7/8	#iDIV/0!	7/8	#iDIV/0!
	9/14	#iDIV/0!	9/14	#iDIV/0!	9/14	#iDIV/0!
	10/14	#iDIV/0!	10/14	#iDIV/0!	10/14	#iDIV/0!
	12/14	#iDIV/0!	12/14	#iDIV/0!	12/14	#iDIV/0!
	13/14	#iDIV/0!	13/14	#iDIV/0!	13/14	#iDIV/0!
	15/14	#iDIV/0!	15/14	#iDIV/0!	15/14	#iDIV/0!
	11/16	#iDIV/0!	11/16	#iDIV/0!	11/16	#iDIV/0!
	17/16	#iDIV/0!	17/16	#iDIV/0!	17/16	#iDIV/0!
	21/31	#iDIV/0!	21/31	#iDIV/0!	21/31	#iDIV/0!
	23/31	#iDIV/0!	23/31	#iDIV/0!	23/31	#iDIV/0!
	26/31	#iDIV/0!	26/31	#iDIV/0!	26/31	#iDIV/0!
	28/31	#iDIV/0!	28/31	#iDIV/0!	28/31	#iDIV/0!
	30/31	#iDIV/0!	30/31	#iDIV/0!	30/31	#iDIV/0!
	33/31	#iDIV/0!	33/31	#iDIV/0!	33/31	#iDIV/0!
	34/31	#iDIV/0!	34/31	#iDIV/0!	34/31	#iDIV/0!
	19/18	#iDIV/0!	19/18	#iDIV/0!	19/18	#iDIV/0!
	20/25	#iDIV/0!	20/25	#iDIV/0!	20/25	#iDIV/0!
	22/24	#iDIV/0!	22/24	#iDIV/0!	22/24	#iDIV/0!
	27/24	#iDIV/0!	27/24	#iDIV/0!	27/24	#iDIV/0!
	29/24	#iDIV/0!	29/24	#iDIV/0!	29/24	#iDIV/0!
	32/24	#iDIV/0!	32/24	#iDIV/0!	32/24	#iDIV/0!

**Figura 52.** Pantalla que se despliega en la pestaña " Relaciones de diagnóstico".

En la pestaña "Coeficientes de variación" se muestran los resultados obtenidos en cuanto a CV de la comparación de cada réplica de las muestras con la fuente. En el caso de que las relaciones de diagnóstico tengan un CV menor a un 14 % la hoja de cálculo coloca la palabra igual. Si existe un CV mayor al 14 % la hoja de cálculo coloca la palabra diferente en la casilla correspondiente. En la Figura 53 se muestra la pantalla que se despliega al acceder a esta pestaña.

Menú	Comparación Fuente-M1			Comparación Fuente-M2		
	Relaciones de diagnóstico	Réplica 1	Réplica 2	Relaciones de diagnóstico	Réplica 1	Réplica 2
	1/2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	1/2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	3/4	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	3/4	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	2/4	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	2/4	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	5/6	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	5/6	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	7/8	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	7/8	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	9/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	9/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	10/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	10/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	12/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	12/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	13/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	13/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	15/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	15/14	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	11/16	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	11/16	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	17/16	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	17/16	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	21/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	21/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	23/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	23/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	26/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	26/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	28/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	28/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	30/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	30/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	33/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	33/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	34/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	34/31	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	19/18	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	19/18	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	20/25	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	20/25	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	22/24	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	22/24	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	27/24	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	27/24	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	29/24	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	29/24	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

Figura 53. Pantalla que se despliega en la pestaña "Coeficientes de variación".

Al acceder en la pestaña "Resultados" se muestra un cuadro donde la hoja de cálculo basándose en los resultados de las pestañas anteriores indica si existen diferencias en cuanto a relaciones de diagnóstico mayores al 14 % en cuanto a CV o no, para definir si la muestra es igual o no a la fuente. En la Figura 54 se muestra la pantalla de la pestaña.



### Anexo 3. Hoja de cálculo de la muestra B y E.

A continuación, se muestran pantallazos de la hoja de cálculo de la muestra que compara las muestras B y E.

Menú	Muestra			Fuente			Muestra	M1		Muestra	Blanco		
	lon	Área 1	Área 2	lon	Área 1	Área 2		lon	Área 1				
	226	10414296	9952152	226	10595543	9819983		226	0,00		226	0,00	
	206	27895187	27395313	206	28108934	26564501		206	0,00		206	0,00	
	220	34247737	32612216	220	34969160	32969160		220	0,00		220	0,00	
	230	53421955	52483303	230	54067555	49462469		230	0,00		230	0,00	
	242	37272553	37801487	242	39058843	36269783		242	0,00		242	0,00	
	192	8209245	8036754	192	7969329	7534994		192	0,00		192	0,00	
		1043343	1026296			1128180			1097163				0,00
		5350760	5393675			5912715			5725608				0,00
		6846837	5351006			4654780			4306949				0,00
	198	1257321	1298467	198	1338874	1282612		198	0,00		198	0,00	
		440904	437840			508541			483824				0,00
	85	2207937,00	2173889,00	85	2420271	2261576		85	0,00		85	0,00	
		801250,00	823392,00			861069			799069				0,00
		2262539,00	2203095,00			1927829			1901129				0,00
		1178449,00	1192566,00			1206284			1171844				0,00
	234	25114782	24726584	234	25698355	23704875		234	0,00		234	0,00	
		1660857	1712905			1548424			1436166				0,00
		4724523	4770160			5154586			4693030				0,00
		3113036	3127588			3528932			3086856				0,00
	123	229610	211550	123	229224	246788		123	0,00		123	0,00	
		142710	127463			178954			194603				0,00
		251697	233445			280375			300875				0,00
		232307	205913			279269			292790				0,00
		345887	305667			387607			413530				0,00
	218	226321	236950	218	--	--		218	0,00		218	0,00	
		258287	328686			--			--				0,00
		230362	255116			--			--				0,00
	231	1455890	1494666	231	1474024	1497017		231	0,00		231	0,00	
		1444309	1524475			1493051			1600795				0,00
		154967	165536			146586			153209				0,00
		419079	420746			415178			425120				0,00
		560635	582026			619418			634968				0,00
		287050	292215			335955			343891				0,00
		460687	474795		478408	487806		0,00					

Figura 56. Datos de las áreas de las muestras B y E.

Menú

Muestra	Fuente
<b>Relación de diagnóstico</b>	
1/2	3,0
3/4	2,7
2/4	1,1
5/6	2,8
7/8	2,1
9/14	0,0
10/14	1,6
12/14	0,9
13/14	0,9
15/14	0,0
11/16	1,5
17/16	0,3
22/24	4,4
27/24	2,4
29/24	1,0
32/24	1,9
38/42	0,5
41/42	2,7
43/42	3,2
44/42	3,4
47/8	1,7
48/50	2,9
51/52	0,3
57/59	2,0
59/24	3,5
11/53	3,3
59/32	1,7
22/27	2,0
29/32	0,9

Muestra	M1
<b>Relación de diagnóstico</b>	
1/2	0,5
3/4	1,1
2/4	3,2
5/6	0,5
7/8	1,7
9/14	4,6
10/14	0,9
12/14	0,6
13/14	0,6
15/14	0,0
11/16	1,3
17/16	2,8
22/24	1,5
27/24	0,1
29/24	0,0
32/24	0,3
38/42	0,2
41/42	0,9
43/42	1,6
44/42	0,4
47/8	0,3
48/50	1,1
51/52	1,2
57/59	3,8
59/24	3,3
11/53	0,4
59/32	3,6
22/27	1,4
29/32	0,3

Figura 57. Relaciones de diagnóstico entre las réplicas de cada muestra (B y E).

Menú	Comparación Fuente-M1		
	Relaciones de diagnóstico	Réplica 1	Réplica 2
	1/2	Igual	Igual
	3/4	Igual	Igual
	2/4	Igual	Igual
	5/6	Igual	Igual
	7/8	Igual	Igual
	9/14	Igual	Igual
	10/14	Igual	Igual
	12/14	Igual	Igual
	13/14	Igual	Igual
	15/14	Igual	Igual
	11/16	Igual	Igual
	17/16	Igual	Igual
	22/24	Igual	Igual
	27/24	Igual	Igual
	29/24	Igual	Igual
	32/24	Igual	Igual
	38/42	Igual	Igual
	41/42	Igual	Igual
	43/42	Igual	Igual
	44/42	Igual	Igual
	47/8	Igual	Igual
	48/50	Igual	Igual
	51/52	Igual	Igual
	57/59	Igual	Igual
	59/24	Igual	Igual
	11/53	Igual	Igual
	59/32	Igual	Igual
	22/27	Igual	Igual
	29/32	Igual	Igual

**Figura 58.** Conclusión de hoja de cálculo a partir de la comparación de las relaciones de diagnóstico de las muestras B y E.

Menú

Fuente-M1	No hay diferencia
Fuente-M1	No hay diferencia

**Figura 59.** Resultado final de la comparación de las muestras B y E a partir del análisis de los datos.