



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

**Estudio de la Validación y Aplicación de Metodología Analítica para la  
Determinación de BTEX en aguas por Cromatografía de Gases en el  
Laboratorio de Desechos Tóxicos de la Universidad Simón Bolívar**

**Trabajo Especial de Grado**

Lic. en Química: Delimar Pérez

Caracas, Marzo 2015



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**POSTGRADO EN ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD**

**ESTUDIO DE LA VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE  
METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
BTEX EN AGUAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES EN EL  
LABORATORIO DE DESECHOS TÓXICOS DE LA UNIVERSIDAD  
SIMÓN BOLÍVAR**

**LIC. EN QUÍMICA DELIMAR PÉREZ**

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título  
de Especialista en Aseguramiento de la calidad

Tutor: PhD en Química: Adelitza Strubinger

## VEREDICTO



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO



### VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo Grado** presentado por la Licenciada en Química **DELIMAR ARMINDA PEREZ LOZADA C.I. 17.057.657**, bajo el título: "**VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE BTEX EN AGUAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES EN EL LABORATORIO DE DESECHOS TÓXICOS DE LA UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **ESPECIALISTA EN ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día martes **10 de marzo de 2015** a la **2:00 pm.**, para que **la autora** lo defendiera en forma pública, lo que **la autora** hizo en **el aula 702**, del 7<sup>mo</sup> Piso de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual **respondió** a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **Aprobarlo** por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por **la autora**, que **se ajusta** a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte importante al estudio de la validación de un método de análisis por Cromatografía de Gases en el área ambiental para hidrocarburos aromáticos como Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos en aguas. Asimismo el jurado acuerda el cambio del título por: "**ESTUDIO DE LA VALIDACIÓN Y APLICACIÓN**

Página 1 de 2

**DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE BTEX EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EN EL LABORATORIO DE DESECHOS TÓXICOS DE LA UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR”.**

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **diez** días del mes de **marzo** del año **2015** conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutora Coordinadora del jurado la Dra. Adelitza Strubinger.



Dra. Miriam Regnaud  
C.I. V- 3.976.826  
Facultad de Farmacia UCV



MSc. Alicia Mariela Rincon  
C.I. V- 4.810.340  
Facultad de Farmacia UCV



Dra. Adelitza Strubinger  
C.I. V- 11.038.494  
Tutora-Coordinadora  
Universidad Simón Bolívar



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y la Virgen por darme salud, esperanza y fuerza para cada día ser una persona mejor.

A la Universidad Central de Venezuela y la Facultad de Farmacia por permitirme continuar creciendo como profesional abriéndome sus puertas nuevamente.

A mi mamá, que siempre ha estado presente para apoyarme en cualquier situación de mi vida dándome ánimo y amor incondicional

A mi tutora Adelitza Strubinger quien creyó en mí y me permitió trabajar con ella apoyándome siempre y asesorándome de la mejor manera que un tutor lo puede hacer.

A mi jefe Andrés Oliveros quien me asesoro en todo momento y fue de gran ayuda para culminar este trabajo

Al Laboratorio de Desechos Tóxicos de la Universidad Simón Bolívar por permitirme realizar allí mi trabajo de grado y facilitarme todo el material posible para culminar con éxito dicho trabajo.

A mis compañeras de postgrado Gaby y Gleidys con las cuales forme un gran equipo de trabajo y fueron un gran apoyo para la culminación de esta meta.

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como principal objetivo la validación de la metodología de análisis de BTEX en el Laboratorio de Desechos Tóxicos (LDT) de la Unidad de Gestión Ambiental-FUNINDES de la Universidad Simón Bolívar, por medio de la aplicación de la técnica de cromatografía de gases por headspace y basándose en la norma ISO/IEC 17025:2005. En el proceso de validación se calcularon los valores para los parámetros que estiman el rendimiento analítico como son: precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y sensibilidad, logrando valores aceptables en algunos parámetros exceptuando los resultados obtenidos en la exactitud. En el caso del límite de detección se obtuvieron valores que van desde 0,004 a 0,012  $\mu\text{g/mL}$ ; para el límite de cuantificación: 0,014 a 0,040  $\mu\text{g/mL}$ ; coeficiente de correlación (R) desde 0,9933 a 0,9970; y las recuperaciones estuvieron por debajo del límite de aceptación.

***Palabras claves:*** Calidad, ISO/IEC 17025:2005; Validación, Cromatografía de Gases, Química Ambiental, BTEX, *Headspace*

## TABLA DE CONTENIDO

VEREDICTO .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	v
RESUMEN.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABLAS .....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
Propiedades Físicas y Químicas de los BTEX .....	1
Fuentes de BTEX.....	3
Uso de los BTEX.....	4
Efectos a la Salud y Medio Ambiente de BTEX.....	5
1. Benceno.....	5
2. Tolueno .....	6
3. Etilbenceno.....	7
4. Xilenos (m-xileno, o-xileno, p-xileno) .....	8
OBJETIVO GENERAL .....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
MARCO TEÓRICO.....	14
Análisis de BTEX en aguas.....	14
Método de muestreo del vapor en equilibrio o “ <i>Headspace</i> ” .....	17
1. Método de muestreo del vapor en equilibrio estático .....	18

2. Método de muestreo del vapor en equilibrio dinámico .....	18
Cromatografía de Gases .....	19
1. Suministro del gas de arrastre .....	21
2. Sistema de inyección de muestra.....	21
3. Columnas tubulares abiertas.....	22
4. Detector de ionización a la llama .....	22
Validación .....	24
1. Normativa 17025 & la Validación.....	26
2. Tipos de validación.....	28
2.1. Validación prospectiva.....	28
2.2. Validación retrospectiva.....	29
2.3. Validación concurrente .....	30
3. Parámetros de Validación .....	31
3.1. Especificidad/selectividad.....	31
3.2. Límite de detección & Límite de cuantificación .....	32
3.2.1. Método basado en el examen visual .....	32
3.2.2. Método basado en la relación señal/ruido.....	32
3.2.3. Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado .....	33
A. Métodos Instrumentales que corrigen la señal frente a un blanco .....	33
B. Métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco.....	34
3.2.4. Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero .....	35



3.2.5. Método EURACHEM para cálculo de límite de cuantificación .....	35
3.3. Linealidad y rango de trabajo .....	36
3.3.1. Evaluación estadística de la linealidad .....	37
A. Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen.....	37
B. Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) ....	38
C. Variancia residual constante (homoscedasticidad).....	39
D. Análisis de la variancia de la regresión lineal.....	39
E. Prueba de linealidad .....	41
F. Prueba de verificación de la pendiente o de linealidad .....	41
G. Test de proporcionalidad .....	42
3.4. Precisión .....	43
3.5. Exactitud.....	47
3.6. Robustez .....	47
METODOLOGÍA .....	49
Materiales y Equipos.....	49
Procedimiento experimental.....	50
1. Preparación de muestras para análisis de BTEX.....	50
2. Cromatografía de gases con detector de ionización a la llama .....	52
3. Parámetros de Validación .....	54
3.1. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	54
3.2. Linealidad.....	54
3.3. Estudio de la precisión .....	55
3.4. Exactitud.....	56
Determinación de la necesidad analítica de la metodologías .....	57

Optimización de las condiciones de operación de la técnica de análisis .....	58
Selección de los objetivos y parámetros de la validación .....	63
Resultados de la Validación de BTEX.....	66
1. Linealidad.....	66
2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) .....	72
3. Precisión.....	75
4. Exactitud .....	85
Declaración de la validación .....	87
CONCLUSIONES .....	88
RECOMENDACIONES .....	89
ANEXO.....	96
Instructivo de validación para la Determinación de BTEX en Muestras Acuosas.....	96

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Método de muestreo del vapor en equilibrio o “ <i>Headspace</i> ”	18
<b>Figura 2.</b>	Clasificación de las técnicas cromatográficas	20
<b>Figura 3.</b>	Componentes de un cromatógrafo de gases	21
<b>Figura 4.</b>	Materiales y equipos empleados en la preparación de muestras por equilibrio en fase de vapor o “ <i>headspace</i> ”. (A) Viales de Sellados, (B) Inyectadora gas tight y (C) Sistema de calentamiento	50
<b>Figura 5.</b>	Esquema de preparación de muestras por vapor en equilibrio o “ <i>headspace</i> ”	52
<b>Figura 6.</b>	Cromatógrafo de gases HP modelo 6890 acoplado a detector de llama	53
<b>Figura 7.</b>	Cromatograma característico del benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y estándar interno para una patrón de concentración 0,05 ppm.	60
<b>Figura 8.</b>	Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el benceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	67
<b>Figura 9.</b>	Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el tolueno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	67

<b>Figura 10.</b>	Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el etilbenceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	68
<b>Figura 11.</b>	Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el m,p-xileno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	68
<b>Figura 12.</b>	Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el o-xileno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	68
<b>Figura 13.</b>	Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del benceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	73
<b>Figura 14.</b>	Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del tolueno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	73
<b>Figura 15.</b>	Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del etilbenceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	73
<b>Figura 16.</b>	Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del m,p-xilenos (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	74
<b>Figura 17.</b>	Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del o-xilenos (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)	74

<b>Figura 18.</b>	Curva de regresión lineal del benceno para diferentes días	76
<b>Figura 19.</b>	Curva de regresión lineal del tolueno para diferentes días	77
<b>Figura 20.</b>	Curva de regresión lineal del benceno para diferentes días	77
<b>Figura 21.</b>	Curva de regresión lineal del m,p-xileno para diferentes días	77
<b>Figura 22.</b>	Curva de regresión lineal del o-xileno para diferentes días	78
<b>Figura 23.</b>	Comparación de la pendiente de la ecuación de regresión lineal de los BTEX para evaluar muestras acuosas (El error corresponde al intervalo de confianza del promedio para un $\alpha=0,05$ ).	79

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b>	Propiedades físicas y químicas de los BTEX	2
<b>Tabla II.</b>	Fuente de los BTEX	3
<b>Tabla III.</b>	Uso de los BTEX	4
<b>Tabla IV.</b>	Concentración máxima de BTEX en aguas potables y efectos para la salud.	10
<b>Tabla V.</b>	Concentraciones máximas permitidas en aguas, suelos y lixiviados de BTEX establecidos en el decreto 2.635	10
<b>Tabla VI.</b>	Valores críticos de BTEX establecidos en la Norma Sanitaria de Agua Potable	11
<b>Tabla VII.</b>	Publicaciones sobre la determinación de BTEX por la técnica de cromatografía de gases acoplada a detector de ionización a la flama (CG/FID).	25
<b>Tabla VIII.</b>	Resumen de cálculos estadísticos asociados a la regresión lineal por mínimos cuadrados.	38
<b>Tabla IX.</b>	Suma de cuadrados para el análisis de varianza en la linealidad	40
<b>Tabla X.</b>	Criterios de aceptación de linealidad	43
<b>Tabla XI.</b>	Análisis simple de varianza o ANOVA	44
<b>Tabla XII.</b>	Obtención de las diferencias cuadráticas medias	45
<b>Tabla XIII.</b>	Condiciones de operación del cromatógrafo de gases con detector de ionización con llama	53
<b>Tabla XIV.</b>	Condiciones de operación recomendadas por el método EPA 8015C	59

<b>Tabla XV.</b>	Parámetros y objetivos de Validación para la determinación de BTEX	65
<b>Tabla XVI.</b>	Resultados obtenidos para el estudio de linealidad en el benceno	66
<b>Tabla XVII.</b>	Resultados obtenidos para los parámetros evaluados en el estudio de la linealidad de la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.	69
<b>Tabla XVIII.</b>	Resultados obtenidos en el estudio de límite de cuantificación y detección para la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.	72
<b>Tabla XIX.</b>	Resultados obtenidos a partir de la curva de regresión de la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.	75
<b>Tabla XX.</b>	Área corregida de los BTEX con el estándar interno para los diferentes patrones de calibración y días del experimento	76
<b>Tabla XXI.</b>	Concentraciones obtenidas por cada analista en el estudio de precisión intermedia de la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.	80
<b>Tabla XXII.</b>	Pruebas de contraste para el rechazo de valores extremos (prueba de Grubb y Dixon) y prueba de comparación de un grupo de varianzas (prueba de Cochran) para la muestra de 0,05 mg/L.	81
<b>Tabla XXIII.</b>	Pruebas de contraste para el rechazo de valores extremos (prueba de Grubb y Dixon) y prueba de comparación de un grupo de varianzas (prueba de Cochran) para la muestra de 0,10 mg/L.	82

<b>Tabla XXIV.</b>	Pruebas de contraste para el rechazo de valores extremos (prueba de Grubb y Dixon) y prueba de comparación de un grupo de varianzas (prueba de Cochran) para la muestra de 0,30 mg/L.	83
<b>Tabla XXV.</b>	Resultados de precisión intermedia y repetibilidad en la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.	84
<b>Tabla XXVI.</b>	Porcentaje de recuperación en la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.	85



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	→	Análisis de varianza
ASTM	→	Sociedad americana para pruebas y materiales
BPM	→	Buenas prácticas de manufactura
BTEX	→	Acrónimo que define la mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos
COVs	→	Compuestos orgánicos volátiles
CV	→	Coeficiente de variación
DHHS	→	Departamento de salud y servicios humanos
ECD	→	Detector de captura de electrones
F	→	Prueba de Fischer
FDA	→	Agencia de alimentos y medicamentos
FID	→	Detector de ionización de llama
G	→	Homogeneidad de varianzas de Cochran
GC	→	Cromatografía de gases
HPLC	→	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IARC	→	Agencia internacional para la investigación del cáncer
IEC	→	Comisión electrónica internacional
ISO	→	Organización internacional de estandarización
IUPAC	→	Unión internacional de química pura y aplicada
LC	→	Límite de cuantificación
LD	→	Límite de detección
LDT	→	Laboratorio de desechos tóxicos
MCL	→	Nivel máximo de contaminante , por sus siglas del inglés “ <i>Maximum Contaminant Levels</i> ”
MCLG	→	Nivel objetivo máximo de contaminante, por sus siglas del inglés “ <i>Maximum Contaminant Level Goal</i> ”

MS	→	Espectrometría de masas
OMS	→	Organización mundial de la salud
PIC	→	Convención e inspección farmacéutica
ppb	→	Partes por billón
ppm	→	Partes por millón
SGC	→	Sistema de gestión de la calidad
t	→	Prueba t de Student
T <sub>eb</sub>	→	Temperatura de ebullición
T <sub>f</sub>	→	Temperatura de fusión
US EPA	→	Agencia de protección ambiental de los estados unidos por las siglas del inglés “ <i>US Environmental Protection Agency</i> ”
UV	→	Ultravioleta

## INTRODUCCIÓN

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) son sustancias químicas que tienen una presión de vapor lo suficientemente altas en condiciones normales para vaporizarse significativamente y entrar a la atmósfera <sup>(1)</sup>. Entre los COVs más comunes se encuentran algunos alcoholes, cetonas, cloruro de vinilo, fenol, hidrocarburos alifáticos y los hidrocarburos aromáticos como los BTEX (Acrónimo que define la mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno) <sup>(2)</sup>.


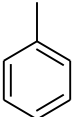
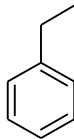
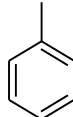
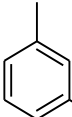
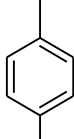
Los hidrocarburos aromáticos son una gran familia de compuestos que tienen un núcleo bencénico en común, cuya estructura suele representarse como la del 1,3,5-ciclohexatrieno. Los compuestos aromáticos fueron llamados así debido al aroma característico asociado a muchos de estos, con el tiempo se observó que tenían otra característica común, su resistencia al ataque químico. El benceno no reacciona con halógenos, ácidos o agentes oxidantes como lo hacen los alquenos en las mismas condiciones. Cuando reacciona un compuesto aromático, el producto suele ser de sustitución en lugar de adición, manteniéndose por lo tanto la integridad del anillo aromático. Así pues la aromaticidad implica una estabilidad química <sup>(3)</sup>.

### PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS BTEX

Los BTEX son hidrocarburos mono-aromáticos de bajo peso molecular, cuya estructura plana característica de las moléculas aromáticas influye en sus propiedades físicas; en la **Tabla I** se presentan algunas propiedades características de estos compuestos <sup>(4)</sup>. Sus densidades son mayores que la de los compuestos alifáticos; así como sus puntos de ebullición y fusión. Sin embargo, en relación al agua tienen una

menor densidad y por esto generalmente los hidrocarburos aromáticos flotan sobre la misma. Los hidrocarburos aromáticos son menos hidrófobos que los alcanos; por su fuerte densidad electrónica. El benceno disuelve 1% en agua y es totalmente miscible con productos de una amplia gama de polaridades: gasolina, éteres, cetonas, alcoholes y ácidos carboxílico, por ello es buen disolvente para reacciones industriales <sup>(5,6)</sup>.

**Tabla I.** Propiedades físicas y químicas de los BTEX

	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	o- xileno	m- xileno	p- xileno
<b>Estructura</b>						
<b>Formula molecular</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>
<b>Masa molecular (g/mol)</b>	78,112	92,139	106,165	106,165	106,165	106,165
<b>Apariencia</b>	Líquido incoloro a amarillo claro	Líquido incoloro	Líquido incoloro	Líquido incoloro	Líquido incoloro	Líquido incoloro
<b>T<sub>FUSION</sub> (°C)</b>	5,49	-94,95	-94,96	-25,2	-47,8	-13,25
<b>T<sub>EBULLICION</sub> (°C)</b>	80,09	110,63	136,19	144,5	139,12	138,37
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,8765	0,8668	0,8626	0,8802	0,8596	0,8566
<b>Solubilidad en agua (a 25°C en g/L)</b>	1,79	0,53	0,17	0,18	0,16	0,16

## FUENTES DE BTEX

Los BTEX pueden proceder de fuentes naturales o artificiales, siendo estas últimas las más importantes. El hecho de que se encuentren de manera natural en el petróleo y en sus derivados hace que la mayoría de procesos de combustión de hidrocarburos (tanto fuentes fijas de diferentes industrias; como fuentes móviles asociadas al tráfico) sean una importantes fuentes de emisión de estos compuestos. A estas hay que añadir los procesos industriales que los emplean como intermediarios para la fabricación de otros productos. En la **Tabla II** se presenta un resumen de las diferentes fuentes de emisión del Benceno <sup>(7,8)</sup>, Tolueno <sup>(9)</sup>, Etilbenceno <sup>(10)</sup> e isómeros del Xileno <sup>(11)</sup>.

**Tabla II.** Fuente de los BTEX

	Origen Natural	Origen Artificial
<b>Benceno</b>	Emisiones de gases volcánicos, incendios forestales, petróleo crudo, carbón, humo del cigarrillo	Refinación del petróleo y petroquímica
<b>Tolueno</b>	Petróleo crudo y árbol de Tolú	Manufactura de la gasolina y otros combustibles a partir del petróleo crudo; en la manufactura de coque a partir del carbón y como subproducto del estireno
<b>Etilbenceno</b>	Alquitrán de carbón y petróleo crudo	Productos manufacturados como tintas, pesticidas y pinturas
<b>Isómeros del Xileno</b>	Petróleo y alquitrán	Se producen a partir del petróleo

Las emisiones de BTEX al medio ambiente se acumulan principalmente en el aire debido a su naturaleza volátil, y en menor proporción en agua y suelo. Los niveles en agua provienen principalmente de derrames de gasolina y otros productos del petróleo y de su uso como disolventes, como también por escapes desde tanques subterráneos en

gasolineras y otras facilidades <sup>(9)</sup>. Aquellos que son vertidos al agua superficial pasan rápidamente al aire por volatilización. Cuando se vierten al terreno, son adsorbidos por el suelo y migran con facilidad hacia el agua subterránea, donde permanecen estables durante largo tiempo.

### USO DE LOS BTEX

El benceno y sus derivados se han utilizado en una variedad de productos, algunos de los cuales incluyen: plaguicidas, detergentes, pinturas, colorantes, lubricantes, gomas, drogas y explosivos; en la **Tabla III** se presentan algunos usos característicos del Benceno <sup>(7,8)</sup>, Tolueno <sup>(9)</sup>, Etilbenceno <sup>(10)</sup> e isómeros del Xileno <sup>(11)</sup>.

**Tabla III.** Uso de los BTEX

	Usos
<b>Benceno</b>	En la industria farmacéutica y química como material de partida e intermediario en numerosos productos químicos; en la producción de etilbenceno, cumeno y ciclohexano; como componente de la gasolina sin plomo debido a sus características antidetonantes; como disolvente en productos como pinturas comerciales e industriales, cementos de caucho, pegamento, removedores de pintura, cuero artificial y productos de caucho; fabricación de calzado, ciertos tipos de gomas de alfombras, detergentes de alfombras, ceras para muebles, disolventes y diluyentes.
<b>Tolueno</b>	Fabricación de pinturas, diluyentes de pinturas, barniz para uñas, lacas, adhesivos y cauchos, en la imprenta y curtido de cueros.
<b>Etilbenceno</b>	Principalmente en la fabricación de estireno, también es usado en combustibles como gasolina y lo contienen las pinturas, tintas, plaguicidas, sustancias para pegar alfombras, barnices, productos de tabaco, productos para automóviles.
<b>Xileno (isómeros)</b>	Disolvente en la imprenta, industrias de caucho y cuero, como agente de limpieza, diluyente de pinturas, en pinturas y barnices; se encuentra en pequeñas cantidades en combustibles de aviones y gasolina, también se usa aunque en menor grado en las industrias químicas, de plástico y de fibras sintéticas y como ingrediente en revestimiento de telas y papeles. Los isómeros del xileno se usan en la manufactura de ciertos polímeros como por ejemplo el plástico.

## **EFFECTOS A LA SALUD Y MEDIO AMBIENTE DE BTEX**

Las rutas más comunes de exposición a BTEX son la inhalación y la ingestión. En la mayoría de los casos los seres humanos estamos expuestos a mezclas de contaminantes, sin embargo la mayoría de los estudios epidemiológicos se han enfocado en evaluar la exposición ocupacional a estos disolventes en forma individual. Los BTEX pueden estar presentes contaminando en aire, el agua y los alimentos.

### **1. BENCENO**

El benceno se encuentra comúnmente en el ambiente y su principal fuente son los procesos industriales. Este puede pasar al aire desde la superficie del agua y del suelo. Para la mayoría de las personas, la exposición al benceno a través de alimentos, bebidas o agua es menor que la exposición a través del aire. El agua potable contiene típicamente menos de 0,1 ppb de benceno. Se ha detectado benceno en algunos alimentos, bebidas alcohólicas y agua embotellada. La fuga de gasolina desde tanques subterráneos o desde vertederos o sitios de desechos peligrosos que contienen benceno puede contaminar el agua de manantiales <sup>(7,8)</sup>.

La exposición breve (5 a 10 minutos) a niveles muy altos de benceno en el aire (10,000 a 20,000 ppm) puede producir la muerte. Niveles más bajos (700 a 3,000 ppm) pueden producir letargo, mareo, aceleración del latido del corazón, dolor de cabeza, temblores, confusión y pérdida del conocimiento. En la mayoría de los casos, los efectos desaparecerán cuando la exposición termina y la persona empieza a respirar aire fresco <sup>(7,8)</sup>.

La ingestión de alimentos o bebidas que contienen niveles altos de benceno puede producir vómitos, irritación del estómago, mareo, somnolencia, convulsiones, aceleración del latido del corazón, coma y la muerte. Al derramar benceno sobre piel, puede sufrir enrojecimiento y ulceración. El contacto con los ojos puede causar irritación y daño de la córnea. Las personas que respiran benceno durante períodos prolongados pueden sufrir daños de los tejidos que producen las células de la sangre, especialmente la médula de los huesos. Una disminución de los glóbulos rojos puede conducir a anemia. La reducción de otros componentes de la sangre puede causar hemorragias. La producción de elementos de la sangre puede normalizarse después que la exposición al benceno termina. La exposición excesiva al benceno puede ser perjudicial para el sistema inmunitario, aumentando las probabilidades de contraer infecciones y posiblemente disminuyendo las defensas del cuerpo contra el cáncer. La exposición al benceno se ha asociado con el desarrollo de un tipo especial de leucemia llamada leucemia mieloide aguda. El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) , la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, por las siglas del inglés “US Environmental Protection Agency”) han determinado que el benceno es carcinogénico en seres humanos <sup>(7,8)</sup>.

## **2. TOLUENO**

Cuando los productos que contienen tolueno se desechan en vertederos o en sitios de desechos, el tolueno puede entrar al suelo y agua cerca del sitio. En general no permanece en el ambiente mucho tiempo ya que es degradado a otras sustancias químicas por microorganismos en el suelo y se evapora desde aguas y suelos



superficiales. El tolueno que se disuelve en agua de pozo no se degrada muy rápidamente mientras el agua permanece bajo tierra porque hay muy pocos microorganismos en el agua subterránea. Una vez que el agua se lleva a la superficie, el tolueno se evaporará al aire. El tolueno puede ser incorporado por peces y mariscos, plantas y animales que viven cerca de aguas que contienen tolueno, pero no se concentra o acumula en altos niveles porque la mayoría de estos organismos pueden degradar al tolueno a otros productos que luego excretan <sup>(9)</sup>.

El efecto principal del tolueno es sobre el cerebro y el sistema nervioso, pero se ha observado que animales expuestos a cantidades moderadas o altas de tolueno también pueden experimentar efectos adversos en el hígado, los riñones y los pulmones. Los estudios en trabajadores y animales expuestos al tolueno generalmente indican que el tolueno no produce cáncer. La IARC y el DHHS no han clasificado al tolueno en cuanto a carcinogenicidad. De igual manera, la US EPA ha determinado que el tolueno no es clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en seres humanos <sup>(9)</sup>.

### **3. ETILBENCENO**

Este se encuentra comúnmente en el aire, proveniente desde el agua y suelo; en el suelo también puede contaminar el agua subterránea. Se degrada en el aire en menos de 3 días con la ayuda de la luz solar; en el agua de superficie, por ejemplo en ríos y lagos, el etilbenceno se degrada al reaccionar con otros compuestos presentes en el agua y en los suelos es degradado por las bacterias <sup>(10)</sup>.

La exposición breve a niveles altos de etilbenceno en el aire puede producir irritación de los ojos y la garganta. La exposición a niveles más altos puede producir mareo.

También se ha encontrado que exposiciones a concentraciones relativamente bajas de etilbenceno producen daño irreversible del oído interno, audición y daño en los riñones. La IARC ha determinado que el etilbenceno es posiblemente carcinogénico en seres humanos <sup>(10)</sup>.

#### **4. XILENOS (M-XILENO, O-XILENO, P-XILENO)**

El xileno es un líquido y puede filtrarse al suelo, aguas de superficie (riachuelos, arroyos, ríos) o al agua subterránea. Este puede entrar al ambiente cuando se manufactura, envasa, transporta o usa. La mayoría del xileno que se libera accidentalmente se evapora al aire, aunque cierta cantidad se libera a ríos o lagos. Cantidades grandes de xileno también pueden entrar al suelo, agua o aire como consecuencia de derrames accidentales o de escapes que ocurren cuando se almacena o entierra en un sitio de desechos <sup>(11)</sup>.

Debido a que el xileno se evapora fácilmente, la mayor parte del xileno que entra al suelo y al agua (si no está atrapado bajo tierra) se evaporará al aire en donde es degradado por la luz solar a otros compuestos menos perjudiciales en un par de días. Por esta razón, raramente se encuentra xileno en concentraciones altas en la superficie del suelo o en agua de superficie (riachuelos, ríos) a menos que recientemente haya habido un derrame o que exista una fuente de contaminación continua. Todo el xileno que no se evapora rápidamente del suelo o agua es degradado por microorganismos. Las plantas, peces y aves incorporan solamente cantidades pequeñas de xileno <sup>(11)</sup>.

El xileno bajo la superficie del suelo puede mobilizarse a través del suelo y entrar al agua subterránea. Este puede permanecer en el agua subterránea durante meses antes de ser finalmente degradado por microorganismos <sup>(11)</sup>.

Se ha descubierto que las tres formas de xileno afectan la salud de manera similar. La exposición breve a niveles altos de xileno puede producir irritación de la piel, los ojos, la nariz y la garganta, dificultad para respirar, alteración de la función pulmonar, retardo de la reacción a estímulos visuales, alteraciones de la memoria, malestar estomacal, y posiblemente alteraciones del hígado y los riñones. La exposición a grandes cantidades de xileno puede producir alteraciones del hígado, los riñones, los pulmones, el corazón y el sistema nervioso. La IARC y la US EPA han determinado que no hay suficiente información para determinar si el xileno es carcinogénico y lo consideran no clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos <sup>(11)</sup>.

En vista de todos los efectos a la salud y al medio ambiente en los cuales están implicados estos compuestos, diferentes entes gubernamentales a nivel mundial se han visto en la necesidad de establecer límites máximos permitidos los cuales no afecten a la salud, uno de ellos es la US EPA, la cual estableció los efectos y límites máximos de BTEX en aguas potables mostrados en la **Tabla IV** <sup>(12)</sup>.

El marco legal venezolano también regula los límites máximos permisibles de los BTEX en aguas potables, desechos y lixiviados según se establece en las normas sanitarias de calidad del agua potable <sup>(13)</sup> publicada en Gaceta Oficial Extraordinaria 36.395 de 1998 y en las normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos, Decreto 2.635 <sup>(14)</sup> publicado en

Gaceta Oficial Extraordinaria 5.245 de 1998. En la Tabla V y Tabla VI se presentan los valores de concentración máximas permitidas para cada una de las normativas, respectivamente.

**Tabla IV.** Concentración máxima de BTEX en aguas potables y efectos para la salud.

Contaminante	MCLG <sup>1</sup> mg/L	MCL <sup>2</sup> mg/L	Efecto potencial para la salud por exposición a largo plazo sobre el MCL	Fuentes de contaminación en aguas potables
<b>Benceno</b>	CERO	0,005	Anemia; disminución de plaquetas en la sangre, se incrementa el riesgo de cáncer	Efluentes de fábricas; filtraciones de tanques de almacenamiento de gas y vertederos
<b>Etilbenceno</b>	0,7	0,7	Problemas en el hígado o riñones	Efluentes de refinerías de petróleo
<b>Tolueno</b>	1	1	Sistema nervioso, problemas en el hígado o riñones	Efluentes de refinerías de petróleo
<b>Isómeros del Xileno</b>	10	10	Daños en el sistema nervioso	Efluentes de refinerías de petróleo. Descarga de industrias químicas

<sup>1</sup> Nivel objetivo máximo de contaminante (MCLG, por sus siglas del inglés *Maximum Contaminant Level Goal*). Corresponde al nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no hay riesgo conocido para la salud, no son objetivos obligatorios de salud pública.

<sup>2</sup> Nivel máximo de contaminante (MCL por sus siglas del inglés *Maximum Contaminant Levels*) y corresponde al nivel más alto de un contaminante que se permite en el agua potable. Los MCL son de cumplimiento obligatorio.

**Tabla V.** Concentraciones máximas permitidas en aguas, suelos y lixiviados de BTEX establecidos en el decreto 2.635

Compuesto	Efecto	Anexo C	Anexo D
		Cantidad crítica (Kg)	Concentración máxima permitida (mg/L)
<b>Benceno</b>	B	5	0,5
<b>Tolueno</b>	C	500	14,4
<b>Etilbenceno</b>	C	500	-
<b>Xileno (isómeros)</b>	B	50	-

B → tóxico por inhalación, ingestión o contacto

C → reactivo, inflamable

**Tabla VI.** Valores críticos de BTEX establecidos en la Norma Sanitaria de Agua Potable

<b>Compuesto</b>	<b>Valor máximo aceptable (µg/L)</b>
<b>Benceno</b>	10
<b>Tolueno</b>	700
<b>Etilbenceno</b>	300
<b>Xileno (isómeros)</b>	500

Concentraciones por encima del nivel máximo de contaminante (MCL) en el aire y agua afectan gravemente la salud humana. Existe, por tanto, una necesidad vital para el desarrollo y validación de métodos analíticos simples, con bajos límites de detección y confiables para la cuantificación de BTEX <sup>(15)</sup>.

El Laboratorio de Desechos Tóxicos (LDT) de la Unidad de Gestión Ambiental-FUNINDES de la Universidad Simón Bolívar al ser un laboratorio que presta servicios especializados de análisis y ensayos físico-químicos ambientales para la industria, tiene la responsabilidad de dar resultados seguros y confiables a sus clientes, los mismos deben cumplir los parámetros de calidad y especificaciones descritas con el fin de asegurar la calidad de sus análisis.

Los criterios mayormente aceptados de un adecuado sistema de control de la calidad para un laboratorio de calibración y/o ensayos, se basan en aspectos técnicos y administrativos establecidos en la ISO/IEC 17025 <sup>(16)</sup>. El cumplimiento de estos requisitos permite al laboratorio obtener beneficios como:

- Mejor desempeño, coordinación y productividad que permite una optimización de los recursos y garantiza un servicio de calidad y oportuno que ofrecer a los clientes.
- Mayor calidad y sustentabilidad de los servicios que se ofrecen respondiendo de manera más efectiva a las demandas de los clientes.
- Una mayor orientación hacia la satisfacción de los clientes.
- Mayor capacidad de competencia frente a otras organizaciones a nivel nacional e internacional; así como la generación de nuevas oportunidades de mercado.

Es por esto que este trabajo está enfocado, en el desarrollo y cumplimientos de los aspectos asociados a la validación de uno de los métodos de análisis que tiene mayor demanda en el laboratorio como es la determinación de BTEX en muestras acuosas; con la finalidad de dar cumplimiento al requisito de validación de la norma ISO 17025:2005 y la política de calidad del laboratorio.

## **OBJETIVO GENERAL**

Validar el método analítico para la determinación de BTEX por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (GC-FID) aplicando la normativa EPA 8015C en el Laboratorio de Desechos Tóxicos de la Universidad Simón Bolívar.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Optimizar la metodología analítica para la determinación de BTEX en aguas
- 2.- Establecer los criterios de Validación a partir de la selección de la metodología analítica para BTEX en aguas.
- 3.- Elaborar el informe de Validación.

## MARCO TEÓRICO

### ANÁLISIS DE BTEX EN AGUAS

Como se ha evidenciado en las secciones previas, el control y remoción de BTEX en aguas potables y residuales tiene gran importancia ambiental, por lo que se han desarrollado diferentes metodologías para su determinación, las cuales incluyen el pre-tratamiento de la muestra y el análisis de la misma.

A continuación se presentan algunas de las metodologías empleadas para la preparación de muestras previas a la determinación de BTEX en aguas: **EPA 3511** Compuestos orgánicos en el agua por micro-extracción <sup>(17)</sup>. **EPA 5030C** Purga y trampa para muestras acuosas <sup>(18)</sup>. **EPA 5032** Compuestos orgánicos volátiles por destilación al vacío <sup>(19)</sup>. **EPA 3510C** Extracción líquido-líquido por embudo de separación <sup>(20)</sup>. **EPA 3520C** Extracción continua líquido – líquido <sup>(21)</sup>. **EPA 5021A** Compuestos orgánicos volátiles en muestras sólidas y varias matrices usando el análisis de vapor en equilibrio, conocido por su término en inglés “*Headspace*” <sup>(22)</sup>.

Metodologías empleadas para el análisis de BTEX en aguas: **ISO 15680** Hidrocarburos aromáticos monocíclicos, naftaleno y varios compuestos clorados por cromatografía de gases mediante desorción térmica y purga & trampa <sup>(23)</sup>. **ASTM D5241** Micro-extracción de agua para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles <sup>(24)</sup>. **ASTM D5790** Compuestos orgánicos purgables en agua por cromatografía de gases con columna capilar acoplado a espectrometría de masas <sup>(25)</sup>. **ASTM D2908** Materia orgánica volátil en agua por cromatografía de gases con inyección acuosa <sup>(26)</sup>. **ASTM D3871** Compuestos orgánicos purgables en agua usando el muestreo



“*Headspace*”<sup>(27)</sup>. **ASTM D6520** Micro-extracción de fase sólida (SPME) de agua y “*Headspace*” para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles<sup>(28)</sup>. **EPA 8021B** Aromáticos y halogenados volátiles por cromatografía de gases utilizando detectores fotoionización y/o de conductividad electrolítica<sup>(29)</sup>. **EPA 8015C** Compuestos orgánicos no halogenados por cromatografía de gases<sup>(30)</sup>. **EPA 624** Compuestos orgánicos purgable por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas<sup>(31)</sup>. **EPA 502.2** Compuestos orgánicos volátiles en el agua por cromatografía de gases usando detector de fotoionización y/o de conductividad electrolítica<sup>(32)</sup>. **EPA 524.2** Compuestos orgánicos volátiles en el agua usando cromatografía de gases<sup>(33)</sup>.

La mayoría de los procedimientos de extracción empleados para la determinación de BTEX en aguas incluyen un sistema de extracción líquido – líquido usando un disolvente orgánico adecuado. Como se extraen Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) a bajas concentraciones, son requeridos solventes orgánicos de alta pureza, los cuales representan un costo adicional para el análisis. Además, muchos de estos pueden ser tóxicos y cancerígenos. Las desventajas de las técnicas de extracción líquido – líquido convencional están hoy bien documentadas y han conducido al desarrollo de métodos alternativos de tratar de reducir los volúmenes de solventes orgánicos requeridos<sup>(34,35)</sup>.

Es por esto que en presente trabajo se ha seleccionado como procedimiento de extracción de los BTEX en agua el muestreo del vapor en equilibrio, conocido por su término en inglés “*Headspace*”. En esta técnica la muestra normalmente se coloca en un frasco sellado y es calentada hasta que los compuestos volátiles alcanzan el equilibrio con la fase gaseosa. Las concentraciones relativas de un determinado analito en las dos

fases son determinadas por el coeficiente de partición, definido como el cociente de la concentración de analito en la fase líquida entre la fase gaseosa. Finalmente, una parte alícuota de la fase gaseosa es analizada por cromatografía de gases <sup>(35)</sup>. Este procedimiento de extracción ofrece varias ventajas: no es costoso, no requiere instrumentación complicada, no es necesario el uso de solventes orgánicos y la sensibilidad de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) se ha mejorado considerablemente en comparación con las técnicas de inyección directa. Además, el análisis de BTEX y otros COVs aplicando el “*headspace*” ha sido adoptado por la US EPA en varios protocolos, tal como la EPA 5021A, así como en la ASTM D3871 <sup>(36,37)</sup>.

Por otra parte, en relación con la técnica de análisis se puede observar que la mayoría de los procedimientos de determinación de BTEX en aguas emplean la técnica de cromatografía de gases (CG) como método de cuantificación. Los principales problemas encontrados durante este análisis son: (1) separación de los componentes de interés de la matriz; especialmente en muestras complejas, (2) alcanzar bajos límites de detección e (3) identificación de contaminantes desconocidos. Los dos primeros pueden solventarse mediante la preparación apropiada de la muestra, incluyendo la pre-concentración, eliminación de la matriz, maximizando la compatibilidad entre el disolvente y el sistema analítico, entre otros <sup>(38,39)</sup>.

La diferencia entre las metodologías que emplean CG es el detector empleado. Para análisis de rutina, se utilizan detectores como el de captura de electrones (ECD, por sus siglas del inglés “*Electron Capture Detector*”) e ionización a la llama (FID, por sus siglas del inglés “*Flame Ionization Detector*”); mientras que en la identificación de contaminantes desconocidos y/o cuando son requeridos menores límites de detección, es

la espectrometría de masa (MS, por sus siglas del inglés “*Mass Spectrometric*”) acoplada al CG la técnica mayormente empleado <sup>(38, 39)</sup>.

En el presente trabajo se emplean la metodología de preparación de muestras establecida en la normativa EPA 5021A para la extracción de los BTEX en agua por “*Headspace*” y su cuantificación por la normativa EPA 8015C por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (GC-FIC). En las siguientes secciones se presentan los fundamentos teóricos asociados a estas metodologías.

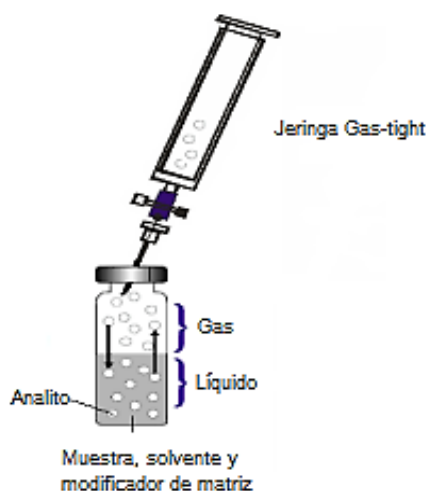
### **MÉTODO DE MUESTREO DEL VAPOR EN EQUILIBRIO O “*HEADSPACE*”**

El muestreo del vapor en equilibrio, conocido por su término en inglés “*Headspace*” (HS) es ampliamente utilizado en el análisis de COVs en suelos, desechos sólidos, soluciones acuosas con analitos miscibles en esta <sup>(22, 27)</sup>. Entre las principales ventajas de esta técnica se pueden mencionar que es un método estandarizado por organismos internacionales como la EPA <sup>(22)</sup> y la ASTM <sup>(27, 28)</sup>, existen diferentes publicaciones <sup>(35-37, 40)</sup> que evalúan su desempeño, la extracción de los analitos (ya sea en aire o en un gas inerte) es compatible con los instrumentos analíticos (columnas cromatográficas, detectores, Etc.), es una técnica rentable y los efectos de la matriz son minimizados. Sin embargo, se deben vigilar ciertos parámetros como la temperatura de extracción, la fuerza iónica, el volumen de muestra extraído, entre otros <sup>(41)</sup>.

Existen dos tipos de HS: los métodos HS estáticos, en donde se realiza la extracción luego de alcanzar el equilibrio de partición entre la fase acuosa y la fase gaseosa y los métodos HS dinámicos, donde los analitos presentes en la matriz acuosa pueden ser extraídos mediante purga y trampa <sup>(21)</sup>.

## 1. MÉTODO DE MUESTREO DEL VAPOR EN EQUILIBRIO ESTÁTICO

En este tipo de técnica se analiza una alícuota de la fase de vapor, la cual se encuentra en equilibrio termodinámico con la fase condensada. La manera más simple consiste en una jeringa que extrae muestra de la fase de vapor, sin pre-concentración aparente (ver **Figura 1**)<sup>(21)</sup>.



**Figura 1.** Método de muestreo del vapor en equilibrio o “*Headspace*”

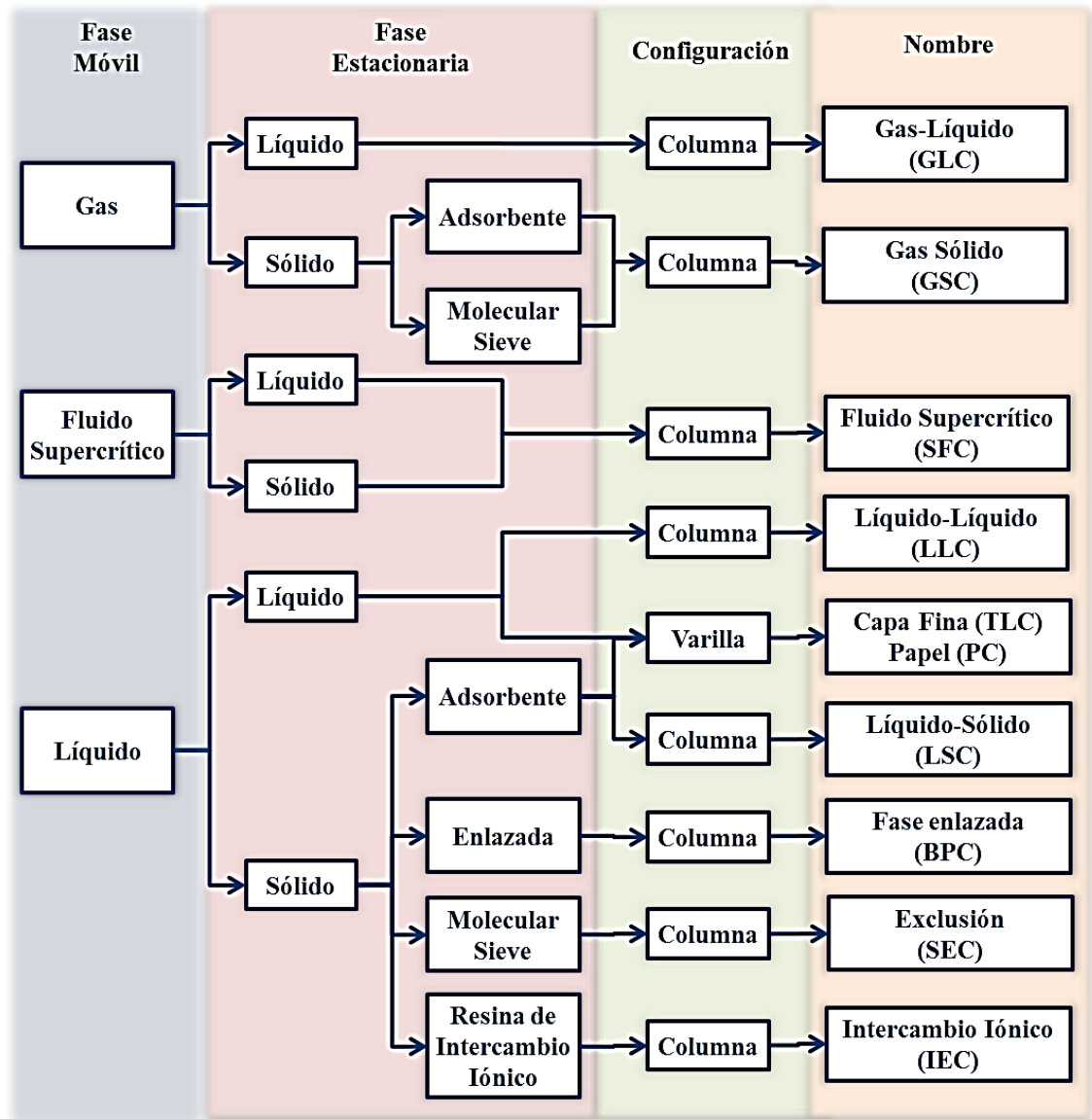
## 2. MÉTODO DE MUESTREO DEL VAPOR EN EQUILIBRIO DINÁMICO

En este tipo de técnica se emplea el principio de purga y trampa, es decir, una corriente de gas inerte para volatilizar los compuestos orgánicos volátiles de la matriz acuosa; hay algunos casos en donde la purga se realiza en la zona de vapor para evitar interferencias de la matriz acuosa. El HS dinámico tiene muchas desventajas asociadas, entre las cuales se pueden mencionar la compleja instrumentación, posible contaminación e interferencia del vapor de agua, y el tiempo de duración de cada extracción que oscila entre 10 y 30 minutos por muestra<sup>(21)</sup>.

## CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía es un método físico de separación, en el cual los componentes se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido o fase móvil que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria <sup>(39,42)</sup>. Existen muchas maneras de clasificar los métodos cromatográficos en relación a sus variantes: tipo de fase móvil (puede ser gaseosa, líquida o fluido supercrítico), fase estacionaria, mecanismo de retención (tipos de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases), forma de contacto entre las fases (columna o superficie plana), dimensionalidad, escala física o gradientes; en la Figura 2 se presenta una clasificación simplificada de algunas técnicas cromatográficas <sup>(39,43)</sup>.

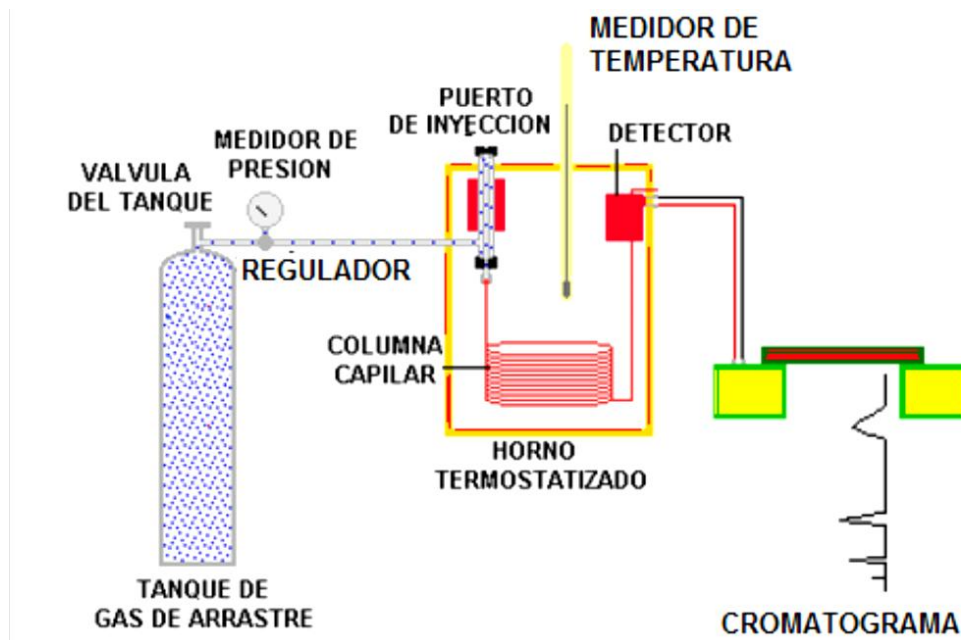
En la cromatografía de gases (GC) se pone en contacto de manera continua y dinámica dos fases inmiscibles que sufren interacciones físico-químicas llamadas repartos, es decir, la distribución de la concentración de cada analito como consecuencia de las fuerzas (dipolo-dipolo, puente de hidrogeno, dispersión de tipo London, exclusión, Van der Waals, iónicas, etc.). La fase móvil es gas y la fase estacionaria un líquido <sup>(39,43)</sup>.



**Figura 2.** Clasificación de las técnicas cromatográficas

La cromatografía de gases involucra la introducción de una muestra vaporizada en la cabeza de la columna. La muestra es transportada por el gas de arrastre hacia el detector, a través de la columna. La elución de los componentes de la muestra en la columna depende de que tan fuerte sea la interacción de los compuestos con la fase estacionaria, el tiempo que tarda un compuesto desde su inyección hasta que llega al detector se

denomina tiempo de retención ( $t_R$ )<sup>(39, 43)</sup>. Los componentes básicos de un instrumento típico para realizar la cromatografía de gases se presenta en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Componentes de un cromatógrafo de gases

## 1. SUMINISTRO DEL GAS DE ARRASTRE

La fase móvil gaseosa debe ser químicamente inerte. El helio es la fase móvil más común, aunque también se emplea argón, nitrógeno e hidrógeno. Estos gases se suministran en tanques presurizados. Se requieren reguladores de presión, calibradores y medidores de flujo para controlar la velocidad de flujo del gas<sup>(39, 43)</sup>.

## 2. SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA

Para que la columna sea eficiente, es necesario que la muestra sea de un tamaño apropiado para que pueda ser introducida como un “tapon” de vapor; la inyección lenta o las muestras de tamaño excesivo causan el ensanchamiento de banda y una resolución

pobre. Se utilizan jeringas calibradas para inyectar muestras a través de un diafragma o septum de caucho o de silicona dentro de una puerta para la muestra, calentada, colocada sobre la cabeza de la columna. Para columnas capilares el tamaño de la muestra es de aproximadamente  $10^{-3}$   $\mu\text{L}$ ; para mantener la cantidad de muestra en este intervalo, se emplea un inyector del tipo *split/splitless*. En el modo “*Split*” la muestra se divide permitiendo pasar a la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechando el resto; mientras que en el modo “*splitless*” toda la muestra se inyecta en la columna <sup>(39, 43)</sup>.

### **3. COLUMNAS TUBULARES ABIERTAS**

Las columnas capilares, fabricadas comúnmente de vidrio o sílice fundida, tienen diámetros interiores de 0,25 a 0,50 mm y longitudes de 25 a 50 m. Sus superficies internas están recubiertas con una capa delgada de la fase estacionaria. La fabricación de columnas de sílice fundida, se basa en técnicas desarrolladas para la producción de fibras ópticas. Los capilares de silicio, cuyas paredes son más delgadas que sus contrapartes metálicas, tienen diámetros exteriores de aproximadamente 0,3 mm. Los tubos tienen una resistencia adicional por una recubierta externa de poli-imida. Las columnas resultantes son muy flexibles y fuertes, y se pueden enrollar en bobinas con diámetros de algunas pulgadas. Una importante ventaja de las columnas de sílice fundida es su tendencia mínima a adsorber moléculas de los analitos.

### **4. DETECTOR DE IONIZACIÓN A LA LLAMA**

Los dispositivos para la detección en la cromatografía de gases deben responder rápidamente a concentraciones muy bajas de solutos. En cualquier instante la



concentración de solutos en el gas de arrastre no es superior a unos pocos ppm y con frecuencia menores en uno o dos órdenes de magnitud. Además, el tiempo durante el cual un pico pasa por el detector normalmente es de un segundo (o menos), lo cual es necesario que el dispositivo sea capaz de responder satisfactoriamente durante este breve periodo. Otras características deseables en un detector son: respuesta lineal, estabilidad, y respuesta uniforme para una amplia variedad de especies químicas, o alternativamente, una respuesta predecible y selectiva hacia uno o más clases de solutos. El detector de ionización a la llama (FID, por sus siglas en inglés “*Flame Ionization Detector*”) es uno de los mayormente usados en CG porque cumple con un gran número de estas características. Otras ventajas deseables en un detector son: respuesta lineal, estabilidad, y respuesta uniforme para una amplia variedad de especies químicas, o, alternativamente, una respuesta predecible y selectiva hacia uno o más clases de solutos.

Estos dispositivos están basados en que la mayor parte de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan en una flama caliente, producen intermediarios iónicos que conducen la electricidad a través de la flama. Con este detector se utiliza hidrógeno como gas de arrastre, el eluyente se mezcla con oxígeno y se quema en un mechero equipado con un par de electrodos. La detección incluye el monitoreo de la conductividad de los productos de combustión. El detector de ionización presenta una sensibilidad elevada ( $\sim 10^{-13}$  g/ml), una gran respuesta lineal y poco ruido. También es robusto y fácil de usar. Una desventaja del detector de ionización es que destruye la muestra <sup>(43)</sup>. En la tabla VII se presentan diferentes trabajos relacionados al estudio y validación de BTEX por cromatografía de gases utilizando un detector de llama (FID),

se muestran las diferentes condiciones de trabajo empleadas; así como algunos resultados asociados a parámetros de desempeño de la metodología.

## **VALIDACIÓN**

Con el objetivo de promover el desarrollo de la estandarización en el año 1947 se crea la ISO, una Organización Internacional no gubernamental establecida en miras de facilitar el intercambio de servicios y bienes, para promover la cooperación en la esfera de lo intelectual, científico, tecnológico y económico; añadiendo valor a todo tipo de organización contribuyendo a que el comercio entre los países sea más fácil y más justo.

Las normas ISO surgen para armonizar la gran cantidad de normas sobre gestión de calidad que estaban apareciendo en distintos países del mundo. Las normas ISO se originaron del consenso entre representantes de los distintos países integrados y sirven para promover los intereses de los consumidores y usuarios en general.

En la actualidad, la permanencia en el mercado de los laboratorios proveedores de servicios depende en gran medida del reconocimiento formal de su competencia técnica, a través de un organismo, sistema o mecanismo confiable de análisis de su calidad. En el laboratorio de desechos tóxicos se plantea la necesidad de promover avances en el reconocimiento de los ensayos de laboratorio, a través del cumplimiento de un conjunto de requerimientos de competencia de gestión y técnica establecidos en la Norma ISO/IEC 17025 <sup>(16)</sup>.

**Tabla VII.** Publicaciones sobre la determinación de BTEX por la técnica de cromatografía de gases acoplada a detector de ionización a la flama (CG/FID).

<b>CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO</b>				
<b>Inyectores</b>				
Modo: Split T: 210 °C Velocidad de flujo: 1,11mL/min	Modo: Splitless T: 250 °C Velocidad de flujo: 1mL/min	Modo: Splitless T: 250 °C Velocidad de flujo: 1mL/min	Modo: Splitless Velocidad de flujo: 0,8mL/min	Modo: Splitless
<b>Columna</b>				
CP-Sil24CB (50% feni, 50% dimetilsiloxano), 30m x 0,32mm ID x 0,25µm; gas: He	CP-Sil, WCOT 30m x 0,25mm ID x 0,25mm; gas: He	CP-Sil5CB 100% polidimetilsiloxano 30m x 0,25mm ID x 0,25µm; gas: He	Columna capilar 60m x 0,32 mm ID. x 1,8µm	BP-5 95% metil 5% fenil copolimero 30m x 0,22mm x 0,25µm
<b>Horno</b>				
60°C - 1min; 100°C - 5°C/min; 200°C - 30°C/min	40°C - 1 min; 60°C -10°C/min-1min; 100°C-10°C/min- 1min; 160°C- 20°C/min-3min	40°C - 5 min; 100°C -10°C/min; 200°C - 20°C/min	40°C - 2min, 140°C- 40°C/min, 200°C - 7°C/min	30°C - 3min, 100°C- 10°C/min, holding 1min
<b>Detector</b>				
T: 250°C Aire: 250mL/min; H <sub>2</sub> : 30mL/min	T: 200°C Aire: 250mL/min; H <sub>2</sub> : 25mL/min	T: 300°C	-	T: 300°C
<b>RESULTADOS EXPERIMENTALES</b>				
<b>Rango lineal</b>				
0,01 - 20 µg/MI	0,05 - 2000 ng/mL	2x10 <sup>3</sup> - 8x10 <sup>3</sup> ; 5x10 <sup>4</sup> - 10x10 <sup>4</sup>	-	0,2 -100 µg/L
<b>Límite de detección</b>				
0,8 - 7 ng/mL	0,002 - 0,8 ng/mL	0,6 - 3 pg/mL	0,22 - 7,48 mg/L	0,1 - 0,2 µg/L
<b>Desviación Estándar Relativa de Repetibilidad,%</b>				
1,81 - 2,47	2,96 - 7,06	4,4 - 5,75	5,62-9,63 cualitativa, 0,02 - 0,19 cuantitativa	0,9 - 6,4
<b>Desviación Estándar Relativa de Reproducibilidad, %</b>				
-	2,26 - 9,04	4,31 - 6,55	-	-
<b>% Recuperación</b>				
89,87 - 98,62	106 – 113	90,21 - 101,91	-	89 – 101
<b>REFERENCIAS ASOCIADAS</b>				
2009 <sup>(44)</sup>	2010 <sup>(1)</sup>	2011 <sup>(15)</sup>	2010 <sup>(40)</sup>	2010 <sup>(45)</sup>

## 1. NORMATIVA 17025 & LA VALIDACIÓN

La implementación y acreditación de un sistema de gestión de la calidad (SGC) bajo la normativa ISO/IEC 17025, permite asegurar análisis confiables y brindar una mejor calidad en los ensayos, todo esto con el fin de satisfacer los requerimientos cada vez mayores de los clientes. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados seguros y confiables.

La normativa ISO/IEC 17025 establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o de calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio <sup>(16)</sup>. Esta norma está dividida en dos secciones, sección 4: Requisitos relativos a la gestión, los cuales establecen las condiciones de gestión del sistema de calidad que un laboratorio de ensayo y calibración debe tener para asegurar su competencia técnica, y la sección 5: Requisitos técnicos, los cuales se dirigen a aquellos factores, que en el caso de un laboratorio, contribuyen a la exactitud, fiabilidad y validez de los ensayos y calibraciones que realiza.

Entre los requisitos técnicos la norma específica en su sección 5.4.5 la validación de métodos, y a su vez en la sección 5.4.5.2 establece que *“el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto”*;

al mismo tiempo especifica que el laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto <sup>(16)</sup>. Es por esto la necesidad de validar los métodos analíticos.

El término validación ha sido definido por muchos autores <sup>(46-48)</sup>. Aunque en todos los casos se incluyen aspectos fundamentales como: (a) especificar e implementar (b) probar si se cumplen las especificaciones, y (c) documentar. Una de las definiciones de validación que hoy es comúnmente aceptada se puede encontrar en las directrices de la FDA 1987, principios generales de validación: *“Establecimiento de pruebas documentadas que proporciona un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que responde a las especificaciones predeterminadas y atributos de calidad”*. Mientras que la guía buenas prácticas de manufactura de los Estados Unidos (BPM), la organización mundial de la salud (OMS), y la convención e inspección farmacéutica (PIC) tienen la siguiente definición para la validación: *“Acción de probar, en conformidad con los principios de las Buenas prácticas de manufactura, que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce realmente a los resultados esperados”* <sup>(46-48)</sup>.

Según la norma ISO/IEC 17025 <sup>(16)</sup> *“la validación 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”*. Por tanto los laboratorios deben demostrar la validez y adecuación al fin previsto de los métodos presentados para su acreditación. Un método debe ser validado cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico en particular. Por ejemplo:

- Un nuevo método desarrollado por el laboratorio para dar solución a una problemática particular.
- Un método estandarizado o normalizado que ha sido revisado para incorporar mejoras, modificaciones o extender su alcance.
- Cuando los resultados del control de calidad indican que un método establecido está cambiando con el tiempo
- Cuando un método establecido es aplicado en un laboratorio distinto, con nuevos analistas o con diferente instrumentación.

Los estudios de validación verifican el sistema en estudio y en condiciones de prueba extremas semejantes a las que cabría esperar durante el proceso, a fin de comprobar que dicho sistema está bajo control. Una vez que el sistema o proceso se ha validado, cabe prever que permanezca bajo control, siempre y cuando no se hagan cambios en el mismo. Si se producen modificaciones o surgen problemas, o si un equipo se sustituye o se cambia de ubicación, habrá que efectuar la revalidación. Los equipos y procesos de importancia crítica se revalidan en forma sistemática a intervalos adecuados a fin de demostrar que el proceso sigue bajo control <sup>(49)</sup>.

## **2. TIPOS DE VALIDACIÓN**

### **2.1. VALIDACIÓN PROSPECTIVA**

En la validación prospectiva de procesos o métodos, un plan experimental llamado protocolo de validación es ejecutado (siguiendo la conclusión de los ensayos de cualificación) antes de que el proceso o método ha sido puesto en uso comercial. La mayoría de los esfuerzos de validación requieren un cierto grado experimentación

prospectiva para generar una data de soporte de la validación. Este tipo particular de validación se lleva a cabo normalmente en relación con la introducción de nuevos productos de fármacos y sus procesos de fabricación. El objetivo de una validación prospectiva es probar o demostrar que el proceso funcionará de acuerdo con un plan maestro de validación o protocolo para un producto piloto (100 × tamaño) ensayos <sup>(50)</sup>

## **2.2. VALIDACIÓN RETROSPECTIVA**

Si un producto se ha venido produciendo por largo tiempo pero no se ha validado de conformidad con un protocolo prospectivo, en algunos casos puede efectuarse una validación retrospectiva cuando la validación concurrente no constituye una opción realista. Es posible examinar y analizar evaluaciones del producto y de los procesos o metodologías; así como de cada una de las pruebas para demostrar la uniformidad e integridad de los procedimientos y procesos. Generalmente esta forma de validación no se acepta por varios motivos: la falta de protocolos de validación suele indicar falta de documentación, y con frecuencia los datos corresponden únicamente a la indicación de aprobado o rechazado, lo que no permite efectuar análisis estadísticos basados en datos numéricos. Además, el análisis retrospectivo sólo se puede practicar con una metodología, sistema, equipo o proceso que no se haya sometido a ninguna revisión, reparación o modificación; por consiguiente, a menos que estos cambios estén bien documentados, no se sabrá qué periodos pueden analizarse retrospectivamente. Esto se aplica igualmente a cambios que en su momento pudieron parecer menores, y sobre los efectos de los cuales no pudo hacerse un análisis específico por falta de una evaluación de la gestión de calidad y de un plan maestro de validación.

En lo que respecta a las pruebas analíticas, es posible analizar retrospectivamente los valores de referencia y testigos de muchas pruebas cuando están bien documentados los números de lote y cualquier cambio que afecte a los parámetros de prueba, los operadores o el equipo. Si se cuenta con datos suficientes, se puede practicar la validación retrospectiva de una valoración analítica <sup>(49)</sup>

### **2.3. VALIDACIÓN CONCURRENTE**

Está basada en los datos recogidos durante la ejecución efectiva de un proceso o método. En esta situación, los datos de validación se reúnen durante varios ciclos del proceso continuo y se evalúan para determinar si éste es válido. Se debe redactar un protocolo para definir la información que ha de recogerse y evaluarse <sup>(49)</sup>.

La consideración más importante para las estrategias de validación del método es el diseño de trabajo experimental de modo que las características adecuadas de validación se estudian simultáneamente, reduciendo así al mínimo el número de experimentos que deben realizarse. Por tanto, es importante desarrollar un protocolo para facilitar el proceso de planificación y ejecución de la validación, donde se incluyen aspectos como: (a) necesidad de la satisfacción de una demanda analítica del laboratorio, (b) Revisión de métodos disponibles y elección del más apropiado, (c) elaboración del procedimientos analítico (d) ajustar y optimizar las distintas variables del método, (e) Selección de los parámetros y criterios de validación, (f) diseño estadístico de experimento para la obtención de los parámetros elegidos, siguiendo el procedimiento, (g) Ejecución de los ensayos diseñados, (h) tratamiento estadísticos de los datos obtenidos y (I) elaboración del reporte de validación <sup>(46-48)</sup>.



### **3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

Finalmente; entre los parámetros de validación mayormente evaluados en los métodos cuantitativos se incluyen:

#### **3.1. ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD**

Es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra <sup>(51)</sup>.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes. El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico.

Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta qué punto se debe buscar interferencias, debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles los criterios de selectividad que debe satisfacer un método pueden diferir dependiendo de la finalidad con que se aplique.

Las conclusiones de los estudios de selectividad están vinculadas al origen de la muestra, la optimización de la preparación, la especificidad de la medida y las condiciones instrumentales. Por tanto, cualquier cambio en las mismas supone una reconsideración del estudio realizado.

### **3.2. LÍMITE DE DETECCIÓN & LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

El límite de detección es cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Mientras que el de cuantificación es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Se expresa como concentración del analito <sup>(51)</sup>. A continuación se presentan algunos procedimientos para la determinación de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) <sup>(51)</sup>

#### ***3.2.1. MÉTODO BASADO EN EL EXAMEN VISUAL***

En este método tanto el LD como el LC podían determinarse a partir del análisis de muestras de concentraciones conocidas y decrecientes del analito, estableciéndose visualmente la mínima concentración detectable así como aquella concentración límite que permite cuantificar con razonable precisión y exactitud la señal obtenida. Esto se debe realizar entre 6 y 10 réplicas para las concentraciones evaluadas <sup>(51)</sup>.

#### ***3.2.2. MÉTODO BASADO EN LA RELACIÓN SEÑAL/RUIDO***

Se establece la señal/ruido que proporciona un blanco (muestra que contiene todos los ingredientes a excepción del analito a estudiar) a partir de su análisis reiterado (se recomienda un mínimo de 6 -10 análisis consecutivos); una vez establecido este valor puede concluirse de forma teórica y aproximada que el LC será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces superior (en ocasiones se admite hasta un valor de 20) a dicho ruido de fondo, y que el LD será igual a la concentración de analito

que proporcione una señal 3 veces superior a éste. La justificación a estos valores fue establecida de acuerdo a los intervalos de confianza de una distribución normal.

Una vez establecida esta concentración preparar un número adecuado de muestras (habitualmente un mínimo de 6) a dichas concentraciones y analizarlas de forma que puedan obtenerse los datos para calcular la precisión y la exactitud en el LC <sup>(51)</sup>.

### **3.2.3. MÉTODO BASADO EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA RESPUESTA DEL BLANCO Y LA PENDIENTE DE LA RECTA DE CALIBRADO**

De acuerdo con la IUPAC (por sus siglas del inglés “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”), puede estimarse el LD y LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de un blanco y la pendiente de la recta de calibrado del analito <sup>(51)</sup>. La expresión a aplicar para este cálculo varía en función de si el método instrumental empleado corrige la señal frente a un blanco o no.

#### **A. Métodos Instrumentales que corrigen la señal frente a un blanco**

Este primer caso correspondería a un método, espectrofotométrico en el que se podría calcular el LD y LC teóricos mediante la expresión <sup>(51)</sup>:

$$C_l = \frac{k * S_{bl}}{b} \quad \text{Ec ( 1 )}$$

Dónde:  $C_l$  es la concentración de analito en el límite de cuantificación o detección;  $k$  la constante que se considera igual a 10 para el LC e igual a 3 para el LD;  $S_{bl}$  la desviación estándar correspondiente a la señal del blanco y  $b$  la pendiente de la curva de calibrado de la respuesta del método frente a la concentración de analito <sup>(51)</sup>.

Evidentemente el rango de esta recta tiene que ser cercano en concentraciones a los niveles límite de cuantificación. Si el método analítico realiza la lectura final por duplicado o triplicado, mejorando con ello la precisión, se ha de introducir en la fórmula el término correspondiente a las réplicas (n) en la siguiente forma <sup>(51)</sup>:

$$C_l = \frac{k * S_{bl}}{b * \sqrt{n}} \quad \text{Ec ( 2 )}$$

***B. Métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco***

El caso en que no se realiza corrección frente a un blanco es típicamente el de métodos cromatográficos, tanto de gases como de líquidos. En éstos se ha de tener en cuenta también la señal media obtenida del análisis correspondiente al blanco, es decir, el ruido de fondo del sistema ( $Y_{bl}$ ) con lo que la expresión final será <sup>(51)</sup>:

$$C_l = \frac{Y_{bl} + (k * S_{bl})}{b} \quad \text{Ec ( 3 )}$$

La aplicación de estas fórmulas sólo es válida si la mayor fuente de variación es debida a la desviación estándar del blanco. Es decir,  $S_{bl} \gg S_a$  (desviación estándar del intercepto); así como la  $S_{bl} \gg S_b$  (desviación estándar la pendiente) <sup>(51)</sup>.

De lo contrario, con el fin de considerar también la falta de linealidad y la existencia de sesgo habría que sustituir en las expresiones anteriores la desviación estándar del blanco  $S_{bl}$  por el término <sup>(51)</sup>:

$$\sqrt{S_{bl}^2 + S_b^2 + (a/b)^2 * S_b^2} \quad \text{Ec ( 4 )}$$

### **3.2.4. MÉTODO BASADO EN LA EXTRAPOLACIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO A CONCENTRACIÓN CERO**

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el cálculo, en ocasiones costoso en tiempo, como se ha podido observar, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Para ello el método utiliza la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los límites esperados, pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje "Y" corresponderá teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero de analito. De la misma manera se sustituye en la fórmula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco <sup>(51)</sup>.

Experimentalmente, consiste pues en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación y calcular la ecuación de la recta de la respuesta frente a Concentración, y aplicar las ecuaciones (1) a la (4), según apliquen.

### **3.2.5. MÉTODO EURACHEM PARA CÁLCULO DE LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Cuando no se existe la posibilidad de tener un blanco o cuando se especifica un criterio concreto de precisión y exactitud, un método experimental, sencillo y eficaz, para el cálculo del LC, es el método EURACHEM <sup>(13)</sup>: consiste en preparar una serie de muestras con cantidades decrecientes de analito y analizar cada una de ellas 6 veces consecutivas, representando el coeficiente de variación (CV, %) de la precisión frente a la concentración de cada muestra.

Normalmente se fija un criterio de precisión de un CV de 10% en el límite de cuantificación, aunque se puede llegar a aceptar hasta un 20%, en función de las características del método. También habrá que fijar un criterio de exactitud que puede asociarse al siguiente intervalo de confianza:

$$\frac{R_m + CV * t_{n-1}}{\sqrt{n}} ; \frac{R_m - CV * t_{n-1}}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec ( 5 )}$$

Dónde:  $R_m$  es la recuperación media;  $n$  el número de ensayos y  $t_{n-1}$  es la  $t$  de Student para  $n-1$  grados de libertad.

Siempre que el valor del 100% esté incluido dentro del intervalo puede considerarse exacto en el nivel de concentración propuesto.

### **3.3. LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO**

Es capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de la prueba de datos variables, que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra. El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito <sup>(51)</sup>.

Para determinar la linealidad se debe tener como criterio mínimo aplicable evaluar dentro del rango establecido al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado. Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones  $X$  (variable independiente o predictiva) y la respuesta  $Y$  (variable dependiente). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo  $y = b * x + a$ , obtenida por un

método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste <sup>(51)</sup>.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas) <sup>(51)</sup>.

### ***3.3.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA LINEALIDAD***

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística.

#### ***A. Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen***

Para realizar esta evaluación es requerido la ejecución de diferentes calculos y pruebas que describen la regresión lineal  $a = y - bx$ , donde a es la ordenada en el origen o intercepto y b es su respectiva pendiente. En la **Tabla VIII** se presenta un resumen de las diferentes ecuaciones empleadas; donde;  $\bar{y}$  es el Área promedio (corregida con el estándar interno), b es la pendiente,  $\bar{x}$  es la concentración promedio de los diferentes patrones, x la concentración de cada patrón y n el número de patrones empleados <sup>(51,52)</sup>.

La pendiente b se encuentra relacionada .con la sensibilidad' del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a, los cambios de la concentración del analito). El término independiente a, u ordenada en el origen, es la

intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

**Tabla VIII.** Resumen de cálculos estadísticos asociados a la regresión lineal por mínimos cuadrados.

<b>Pendiente</b>	$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}$
<b>Intercepto</b>	$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$
<b>Coefficiente de correlación</b>	$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}}$
<b>Varianza residual</b>	$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$
<b>Varianza de la pendiente</b>	$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}$
<b>Varianza del intercepto</b>	$S_a^2 = S_b^2 \times \frac{\sum x^2}{n}$

### ***B. Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>)***

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables <sup>(51)</sup>.

La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica 'por si sola' la linealidad, siendo r<sup>2</sup> o coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo <sup>(51)</sup>.



### ***C. Variancia residual constante (homoscedasticidad)***

La representación de los residuales ( $e_i = \bar{y}_i - y_i$ ) aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abcisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia <sup>(51)</sup>.

### ***D. Análisis de la variancia de la regresión lineal***

Para poder realizar el análisis de variancia se deben cumplir los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los residuales. Para asegurar la homogeneidad de las varianzas de los valores que intervienen en la regresión, se puede emplear la prueba de Cochran. Esta permite decidir si hay diferencias entre las varianzas de una serie de repeticiones de los valores obtenidos, por ende si la varianza de algún valor es extrema (excesivamente grande) en comparación con el resto del grupo de varianzas.

El método de Cochran se basa en comparar el estadístico de prueba para la comparación de la homogeneidad ( $G_{exp}$ , ver ecuación 11) con los valores críticos tabulados en función de los grados de libertad, el número de valores y la confianza establecida en la prueba. Si el valor obtenido es menor al valor tabulado se puede hablar de homogeneidad en la varianza <sup>(52)</sup>.

$$G_{exp} = \frac{s_{max}^2}{\sum s_i^2} \quad \text{Ec ( 6 )}$$

Donde;  $s_{max}^2$  es la mayor varianza existente entre el grupo de resultados y  $s_i$  son cada una de las varianzas de los diferentes valores que se están comparando.

Por otra parte, La normalidad de los residuales se puede comprobar mediante la representación gráfica a través de algunos programas estadísticos o bien aplicando un test de normalidad <sup>(51)</sup>.

Una vez comprobados estos supuestos, es posible ejecutar el análisis de varianza aplicando las diferentes ecuaciones presentadas en la **Tabla IX**. A partir de los cuales se calcularán los estadísticos  $F_1$  y  $F_2$ . Cuando el  $F_1$  calculado es mayor que el  $F$  tabulado, obtenido de las tablas de  $F$  de Fisher en función de los grados de libertad (ver **Tabla IX**) y del grado de significación  $\alpha$  usualmente de 0,5; se demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero. Mientras, si el  $F_2$  calculado es menor que el  $F$  tabulado, se demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos <sup>(51)</sup>.

**Tabla IX.** Suma de cuadrados para el análisis de varianza en la linealidad

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	$F_{calculados}$
<b>Regresión</b>	$SC_{reg} = \sum n_i(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$V_{reg} = \frac{SC_{reg}}{1}$	$F_1 = \frac{V_{reg}}{V_{res}}$
<b>Falta de ajuste</b>	$SC_{FA} = \sum n_i(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$k - 2$	$V_{FA} = \frac{SC_{FA}}{k - 2}$	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{exp}}$
<b>Error experimental</b>	$SC_{exp} = \sum \sum (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$\sum_i n_i - k$	$V_{exp} = \frac{SC_{exp}}{\sum_i n_i - k}$	
<b>Total</b>	$SC_T = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_i n_i - 1$	$V_t = \frac{SC_T}{\sum_i n_i - 1}$	

Donde;  $i$  son las series;  $j$  los grupos,  $\hat{y}_i$  es calculado a partir de la curva de regresión para cada  $x_i$ ,  $\bar{y}$  es la media de todos los grupos (gran media),  $\bar{y}_j$  es la media de los  $k$  grupos,  $k$  es el número de grupos,  $V_{reg}$  es la varianza de la regresión,  $V_{res}$  es la varianza residual,  $V_{FA}$  la varianza por falta de ajuste,  $V_{exp}$  la varianza experimental y  $SC_{RES} = SC_{EXP} + SC_{FA}$ .

### ***E. Prueba de linealidad***

El factor de respuesta ( $f$ ) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. Valores del coeficiente de variación superior al 5% serian indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables valores no superiores al 2%. El coeficiente de variación del factor de respuesta se obtiene de la ecuación <sup>(51)</sup>:

$$\%CV = \frac{S_f}{\bar{f}} * 100 \quad \text{Ec ( 7 )}$$

Donde;  $S_f$  es desviación estándar de los factores de respuesta,  $\bar{f}$  el valor medio de los factores de respuesta y  $f$  es calculado como  $f = y_i/x_i$ .

### ***F. Prueba de verificación de la pendiente o de linealidad***

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba  $t$  de Student para un grado de significación igual a 0,05. Para esto se calcula el estadístico de prueba presentado en la ecuación 8, el cual si es mayor que el

valor de t de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación a igual a 0,05, se puede afirmar que la pendiente es distinta de cero <sup>(51)</sup>.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad \text{Ec ( 8 )}$$

Donde  $S_b$  se obtiene de la ecuación presentada en la **Tabla VIII**.

También es habitual calcular los intervalos de confianza a partir de la expresión  $b \pm tS_b$ , siendo en este caso t el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación a igual a 0,05. Estos intervalos de confianza no deberían incluir el cero <sup>(51)</sup>.

### ***G. Test de proporcionalidad***

Este permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito a valor nominal. Para llevar a cabo este test se recurre como en el caso anterior a una prueba de significación t de Student (n-2 grados de libertad,  $\alpha = 0,05$ ), calculando el estadístico de prueba como <sup>(51)</sup>:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} \quad \text{Ec ( 9 )}$$

Donde  $S_a$  se obtiene de la ecuación presentada en la **Tabla VIII**.

Cuando este estadístico de prueba es menor que el valor de t de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación a igual a 0,05; se puede afirmar que la ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero. Mientras

que para los intervalos de confianza ( $a \pm tS_a$ ) se debe verificar que el mismo incluye al cero <sup>(51)</sup>.

Finalmente, para saber si un método de análisis presenta linealidad, la regresión lineal de los valores obtenidos deben cumplir con varios criterios de aceptación, los cuales están resumidos en la **Tabla X**.

**Tabla X.** Criterios de aceptación de linealidad

Criterio de aceptación	Condición
<b>Regresión lineal</b>	Recta con pendiente diferente de cero
<b>Intercepto</b>	$\sim 0$
<b>Coefficiente de correlación</b>	$r \geq 0,99$
<b>Coefficiente de determinación</b>	$r^2 \geq 0,98$
<b>Homogeneidad de las varianzas</b>	$G_{exp} < G_{TABLA}$
<b>Normalidad de los residuales</b>	$F_{1exp} > F_{1TABLA}$ $F_{2exp} < F_{2TABLA}$
<b>Variación del factor de respuesta</b>	$CV_f < 20\%$
<b>Test de verificación de la pendiente o de linealidad</b>	$t_{s\ exp} > t_{s\ TABLA}$
<b>Test de proporcionalidad</b>	$t_{s\ exp} < t_{s\ TABLA}$

### 3.4. PRECISIÓN

Expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión es usualmente evaluada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad <sup>(51)</sup>.

**Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos instrumento, reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto <sup>(51)</sup>.

**Precisión intermedia:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, instrumentos, días, etc.) y en un mismo laboratorio <sup>(51)</sup>.

**Reproducibilidad:** estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios<sup>(51)</sup>.

El estudio de la precisión se puede realizar calculando, a través del análisis simple de varianza o ANOVA (acronimo ampliamente usado del nombre en ingles, “ANalysis Of VAriance”) de dos factores totalmente anidados homogéneos, que corresponden a las desviaciones estándar de repetibilidad ( $s_r$ ) y de reproducibilidad ( $s_R$ ) para cada uno de los niveles de ensayo. En la **Tabla XI** se muestra el esquema a seguir para realizar un análisis simple de la varianza <sup>(13)</sup>.

**Tabla XI.** Análisis simple de varianza o ANOVA

Variables j	Condiciones i				
	i <sub>1</sub>	i <sub>2</sub>	i <sub>3</sub>	i <sub>4</sub>	i <sub>5</sub>
j <sub>1</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>21</sub>	C <sub>31</sub>	C <sub>41</sub>	C <sub>51</sub>
j <sub>2</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>22</sub>	C <sub>32</sub>	C <sub>42</sub>	C <sub>52</sub>
j <sub>3</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>23</sub>	C <sub>33</sub>	C <sub>43</sub>	C <sub>53</sub>

Las medias de cada condición están definidas por:

$$\bar{C}_i = \frac{\sum_{j=1}^j C_{ij}}{i} \quad \text{Ec ( 10 )}$$

La media general es:

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j C_{ij}}{i \cdot j} = \frac{\sum_{i=1}^i j \cdot \bar{C}_i}{i \cdot j} = \frac{\sum_{i=1}^i \bar{C}_i}{i} \quad \text{Ec ( 11 )}$$

En la **Tabla XII** se muestra la manera de determinar las diferencias cuadráticas medias entre los valores que se están evaluando para así obtener las desviaciones estándar de repetibilidad y reproducibilidad o precisión intermedia.

**Tabla XII.** Obtención de las diferencias cuadráticas medias

Origen de la varianza	Grados de libertad ( $\nu$ )	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/ $\nu$ )
<b>Entre grupos</b>	$\nu_1 = i-1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^i j(\bar{C}_i - \bar{C})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{\nu_1}$
<b>Dentro del grupo</b>	$\nu_2 = i \cdot j - i$	$SDC_W = \sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j (C_{ij} - \bar{C}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{\nu_2}$
<b>Total</b>	$\nu = i \cdot j - 1$ (= $\nu_1 + \nu_2$ )	$SDC_G = \sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j (C_{ij} - \bar{C})^2$ (= $SDC_B + SDC_W$ )	$DCM_G = \frac{SDC_T}{\nu}$

De acuerdo a ISO 5725 <sup>(53)</sup>, la desviación estándar de repetibilidad ( $s_r$ ) y la desviación estándar de reproducibilidad ( $s_R$ ) se definen como:

$$s_r = \sqrt{DCM_w} \quad \text{Ec ( 12 )}$$

$$s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2} \quad \text{Ec ( 13 )}$$

Donde:

$$s_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_w}{i} \quad \text{Ec ( 14 )}$$

Si, por efectos aleatorios,  $s_L^2 < 0$ , debe asumirse  $s_L^2 = 0$  (normalmente debería cumplirse que  $DCM_B > DCM_w$  y en caso contrario deberían existir razones que lo justificaran).

Las  $s_r$  y  $s_R$  del método estarán comprendidas entre el valor menor y el valor mayor de todas las desviaciones típicas calculadas (todos los niveles) (o CV's si se quiere presentar en términos relativos, que es más comparable). A partir de estos valores es posible determinar los límites de repetibilidad y reproducibilidad, definidos a continuación.

**Límite de repetibilidad ( $r$ ):** valor máximo, con una probabilidad del 95 %, de la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones de repetibilidad <sup>(54)</sup>.

$$r = t_\alpha \sqrt{2 s_r} \quad \text{Ec ( 15 )}$$

**Límite de reproducibilidad ( $R$ ):** valor máximo, con una probabilidad del 95 %, de la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad <sup>(54)</sup>.

$$R = t_\alpha \sqrt{2 s_R} \quad \text{Ec ( 16 )}$$



Si el intervalo de trabajo del método es muy amplio, es razonable esperar que las  $s$  sean significativamente diferentes para cada punto de la función de respuesta del método, lo que obligaría a tomar decisiones relativas a la definición de su uso por tramos. (En algunos casos podría ser conveniente tratar de establecer si existe alguna relación funcional entre las  $s$  y los respectivos niveles de ensayo) <sup>(13)</sup>.

### **3.5. EXACTITUD**

Es el grado de concordancia entre los valores que son aceptados (verdaderos convencionales o referencia aceptado) y el valor encontrado. Esta se reporta generalmente como porcentaje de recuperación <sup>(51)</sup>.

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado. La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza:

$$\%R = \frac{X_m}{\mu} \times 100 \quad \text{Ec ( 17 )}$$

Donde  $X_m$  es el valor medio obtenido y  $\mu$  es el valor aceptado como verdadero

### **3.6. ROBUSTEZ**

Es la capacidad que tiene un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o “estabilidad” durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que

demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados validos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización <sup>(30)</sup>.

## METODOLOGÍA

### MATERIALES Y EQUIPOS

- **Solución patrón California PVOC** mezcla catalogo # MBTEX-2RPM de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (ChemService) de los siguientes compuestos: benceno, etilbenceno, tolueno, p-xileno, m-xileno, o-xileno, terbutilmetileter. Se preparó un patrón de 10  $\mu\text{g/mL}$  en metanol grado HPLC (MERCK) y a partir de ese patrón se prepararon las disoluciones de trabajo en concentraciones entre 0.03 y 0.3  $\mu\text{g/mL}$  por volumen en agua destilada.
- **Solución patrón de estándar interno** M-8020-IS-10X de 2.0  $\mu\text{g/mL}$  (AccuStandard) del siguiente estándar interno:  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorotolueno. Se preparó un patrón de 10  $\mu\text{g/mL}$  en metanol grado HPLC (MERCK) y a partir de este patrón se adiciono 0,05  $\mu\text{g/mL}$  a cada muestra.
- **Solventes grado analítico**, tales como benceno (MERCK - Schuchardt), tolueno (MERCK), etilbenceno (J.T. Baker Chemical Co.), xilenos (Riedel-de Haën) y metanol HPLC (MERCK). Empleados para la preparación de una solución estándar de la mezcla primaria con una concentración de 100.000  $\mu\text{g/mL}$  de cada componente de BTEX, a partir de los analitos puros por peso en metanol. A partir de esta mezcla se preparó una solución de trabajo de 10  $\mu\text{g/mL}$ , en metanol. Finalmente de esta solución se prepararon las mezclas secundarias, para pruebas de precisión y exactitud, por dilución en volumen de agua destilada a las concentraciones de 0,05, 0,10 y 0,30  $\mu\text{g/mL}$ .

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE BTEX

Los materiales empleados en la preparación de las muestras (ver **Figura 4**) corresponden a Jeringas gas tight de 10 mL (marca SGE), viales de vidrio de 22 mL con septum de goma y anillos de aluminio para sellar el mismo; así como una plancha de calentamiento (marca Corning).



(A)



(B)



(C)

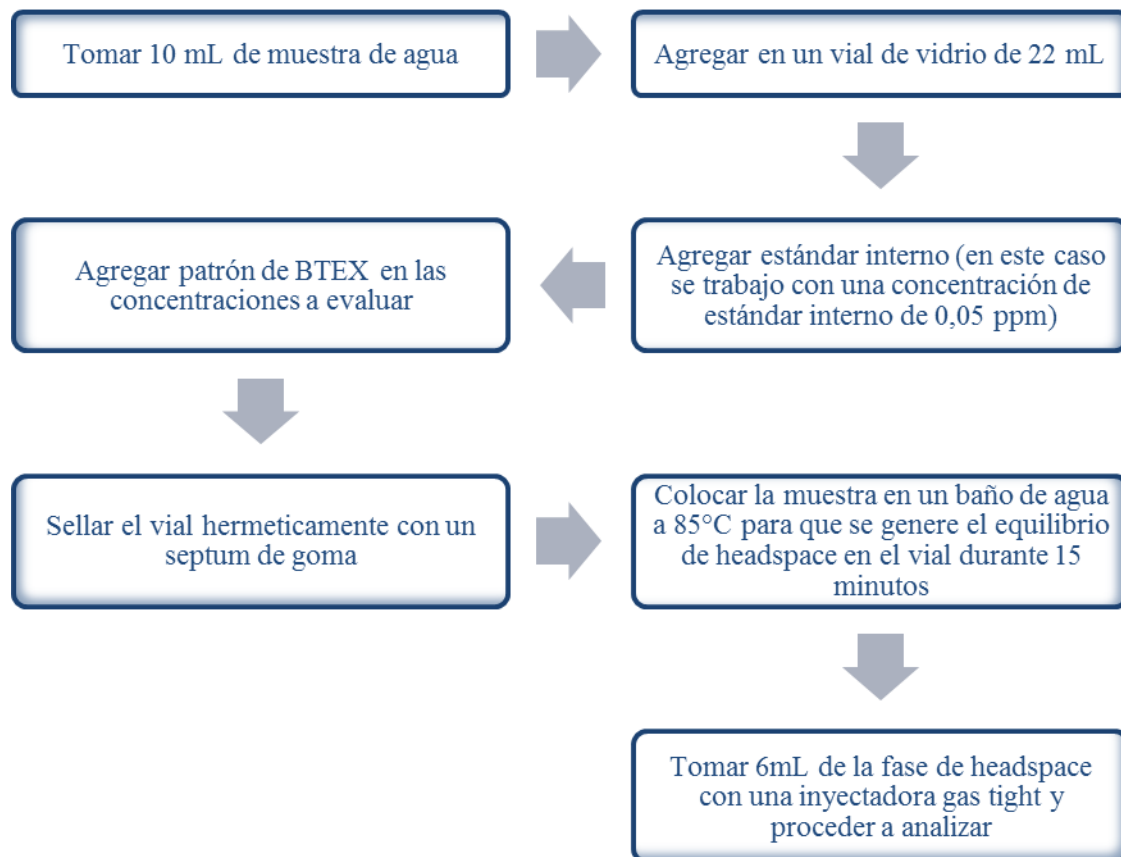
**Figura 4.** Materiales y equipos empleados en la preparación de muestras por equilibrio en fase de vapor o “*headspace*”. (A) Viales de Sellados, (B) Inyectadora gas tight y (C) Sistema de calentamiento

El procedimiento de preparación de muestras acuosas para el análisis de BTEX que emplea el laboratorio de desechos tóxicos de la USB y que requiere del proceso de validación, corresponde a la aplicación del método normalizado EPA 5021A <sup>(22)</sup>, el cual

es recomendado en la normativa EPA 8015C <sup>(30)</sup>. En el alcance del mismo se establece que: *“...es un método de uso general para la preparación de compuestos orgánicos volátiles (COV) en suelo/sedimentos, residuos sólidos, muestras acuosas y muestras líquidas miscible en agua para su análisis por cromatografía de gases (GC) o por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS). El método es aplicable a una amplia gama de compuestos orgánicos que tienen volatilidad suficientemente alta para ser removidos efectivamente de muestras usando un procedimiento de equilibrio en fase de vapor (headspace)...”*.

En la **Figura 5** se presenta un esquema que resume las diferentes etapas de la preparación de las muestras y patrones. Esta implica inevitablemente alguna manipulación de la muestra y exposición a la atmósfera del laboratorio; es por esto que durante todo el procedimiento se debe tener precaución extrema para minimizar cualquier volatilización de los analitos. La primera precaución es preparar las muestras inmediatamente después retirarlas de almacenamiento en frío; debido a que los beneficios de su manipulación en frío (menos volátiles) son sustancialmente mayores que las desviaciones introducidas debido la medición de volumen a bajas temperaturas.

Por otra parte, el método describe que para el blanco se debe tomar agua libre de compuestos orgánicos, en este caso se usó agua destilada y se agregó la cantidad indicada de estándar interno. Finalmente, es importante resaltar que en el presente trabajo son validados los procedimientos de preparación de las muestras una vez han sido ingresadas en el laboratorio y no presente validar procedimientos de muestreo, manejo y preservación de muestras en campo (sección 8 de la norma EPA 5021A <sup>(22)</sup>)



**Figura 5.** Esquema de preparación de muestras por vapor en equilibrio o “*headspace*”

## 2. CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN A LA LLAMA

Para los análisis por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (GC-FID) se empleó un equipo marca Hewlett Packard 6890 (ver **Figura 6**), en la **Tabla XIII** se presentan en detalles las condiciones cromatográficas empleadas para lograr la separación óptima de cada componente, así como las características de la columna, según las recomendaciones indicadas en la normativa EPA 8015C <sup>(30)</sup>. Todos los gases empleados fueron de alta pureza, el helio usado como gas de arrastre; así como el hidrógeno y aire para el detector de ionización a la llama.



**Figura 6.** Cromatógrafo de gases HP modelo 6890 acoplado a detector de llama

**Tabla XIII.** Condiciones de operación del cromatógrafo de gases con detector de ionización con llama

<b>Inyector</b>	<b>Modo</b>	Split			
	<b>Temperatura</b>	250°C			
	<b>Presión</b>	15,41 psi			
	<b>Flujo total</b>	41,6 mL/min			
	<b>Split radio</b>	25 : 1			
	<b>Split flujo</b>	37,4 mL/min			
	<b>Gas servido</b>	20 mL/min a 2 min			
	<b>Tipo de gas</b>	Helio			
	<b>Volumen de inyección</b>	6MI			
<b>Columna</b>	<b>Modelo</b>	Columna capilar de silice fundido Rxi-5ms marca RESTEK de 30m, 250 µm de diámetro interno, 0,25µm de espesor de película; catalogo # 13423 serial # 823634			
	<b>Modo</b>	Flujo constante			
	<b>Flujo inicial</b>	1,5 mL/min			
	<b>Presión</b>	15,42 psi			
	<b>Volumen promedio</b>	33 cm/s			
<b>Horno</b>	<b>#</b>	<b>Rampa °C/min</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Tiempo Total (min)</b>
	<b>0</b>	-	35	3,0	3,0
	<b>1</b>	6,0	80	0,0	10,50
	<b>2</b>	30,0	250	0,0	16,17

### **3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

A continuación se presenta como se determinaron cada uno de los parámetros de validación para cada compuesto (benceno, tolueno, etilbenceno, m,p,o-xileno) con sus respectivos criterios de aceptación y cálculos asociados.

#### **3.1. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)**

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación de cada compuesto se realizaron curvas de calibración en niveles bajos de concentración. Estos fueron: 0,005; 0,008; 0,01; 0,03; 0,05 µg/mL; estas medidas fueron realizadas por quintuplicado para cada nivel de concentración. Los cálculos realizados corresponden a los presentados en la sección la sección 3.2 sobre validación en el marco teórico.

#### **3.2. LINEALIDAD**

Para determinar la linealidad se evaluaron cada uno de los compuestos en 10 niveles de concentración diferentes (0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,15; 0,18; 0,21; 0,24; 0,27; 0,30 µg/mL) por triplicado y en condiciones de precisión intermedia; estos compuestos fueron evaluados a partir de las soluciones diluidas del patrón certificado de BTEX descrito en los materiales y se empleó la metodología descrita para la preparación de muestras por “*headspace*” de EPA 5021A <sup>(22)</sup> y análisis por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (GC-FID) según la normativa EPA 8015C <sup>(30)</sup>. Los resultados obtenidos fueron evaluados aplicando las diferentes pruebas estadísticas presentadas en la sección 3.3 sobre validación en el marco teórico.



### 3.3. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

Este se realizó a partir de los resultados obtenidos del análisis por duplicado en al menos tres niveles de concentración preparados a partir de los solventes puros (benceno, tolueno, etilbenceno, y la mezcla de xilenos); las cuales fueron analizadas en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Es decir, cada analista realizó sus replicados en condiciones de repetibilidad, para los tres niveles de concentración estudiados. Mientras que para cada nivel de concentración se tienen al menos tres conjuntos de resultados en condiciones de precisión intermedia; es decir se realizaron en días distintos, por analistas diferentes, empleando los mismos equipos y dentro de la rutina del laboratorio. En todos los casos se aplicó el procedimiento de preparación por “*headspace*” y análisis por GC-FID, previamente descrito.

Para determinar la concentración de cada compuesto en las muestras de trabajo se realizó la extrapolación de la ecuación de regresión lineal obtenida por medio de las curvas de calibración realizadas para cada día y aplicando la corrección de cada una de las áreas con el área correspondiente al estándar interno. Los resultados obtenidos fueron evaluados aplicando las diferentes pruebas estadísticas presentadas en la sección 3.3 sobre validación en el marco teórico; a partir de las cuales se pueden obtener, en acuerdo a la normativa ISO 5725 <sup>(53)</sup>, la desviación estándar de repetibilidad ( $s_r$ ) y la desviación estándar de reproducibilidad ( $s_R$ ) para cada uno de los compuestos de interés (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y los diferentes niveles de concentración evaluados.

### 3.4. EXACTITUD

La exactitud del método se establece por la comparación de los resultados obtenidos en el diseño experimental de las muestras de trabajo preparadas a partir de los solventes puros con los valores teóricos de concentración a tres niveles diferentes, observando el grado de concordia entre el valor obtenido y el valor esperado. La recuperación en cada punto se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Re cuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100 \quad \text{Ec ( 18 )}$$

Dónde,  $C_{\text{obtenido}}$  es el resultado obtenido del análisis de la muestra de trabajo y  $C_{\text{esperado}}$  es el valor esperado de la misma.

La recuperación global del método se calculo a partir de la media de los valores individuales de recuperación para los tres niveles de concentración estudiada, luego de verificar a través de una comparación de medias por un análisis de varianza que las recuperaciones en los diversos niveles son similares.

Si la recuperación no es similar en las distintas concentraciones del intervalo de trabajo y se observa que existe una posible relación entre la concentración y la recuperación (positiva o negativa), para la cuantificación de las muestras reales se deberá establecer una función que relacione el nivel de concentración con recuperación o recurrir sistemáticamente al método de adiciones estándar

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DETERMINACIÓN DE LA NECESIDAD ANALÍTICA DE LA METODOLOGÍAS

El laboratorio de desechos tóxicos es responsable de la determinación cuantitativa de benceno, tolueno, etilbenceno, o-m-p xilenos (BTEX) en diferentes muestras acuosas suministradas por sus clientes, cuyos orígenes son mayormente efluentes de plantas de tratamiento, aguas superficiales asociadas a ríos y lagos, aguas subterráneas, redes cloacales y agua potable.

La presencia de los BTEX en las aguas ofrece evidencia de contaminación antropogénica por hidrocarburos, cuyos niveles son incluidos en muchas normativas de seguridad ambiental y ocupacional <sup>(7, 9-12)</sup>; así como en el marco legal venezolano <sup>(13, 14)</sup>. Debido a que un porcentaje importante de muestras analizadas en el laboratorio corresponde a niveles de concentración de BTEX en agua < 0,2-0,3 ppm, en el estudio de validación se ha establecido como alcance la determinación a niveles bajos.

Es en el marco de estos requerimientos que el LDT ha seleccionado metodologías normalizadas y reconocidas en el ámbito nacional e internacional <sup>(1, 34)</sup> para la determinación de los BTEX en aguas. Estas corresponden al métodos **EPA 5021A** <sup>(22)</sup> para la extracción de los compuestos orgánicos volátiles usando el análisis de vapor en equilibrio, conocido por su término en inglés “*Headspace*” y el análisis por la normativa **EPA 8015C** <sup>(30)</sup> aplicando la técnica Cromatografía Gaseosa con detector de ionización a la llama. Esto con la finalidad de asegurar la calidad de los resultados a través de la aplicación de procedimientos y métodos que sean confiables y seguros.

## OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS

La “Puesta a punto” de un método es una actividad previa a la validación que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento general del mismo. Con esta actividad se consigue que el método “funcione” produciendo unas respuestas razonablemente aceptables y consistentes.

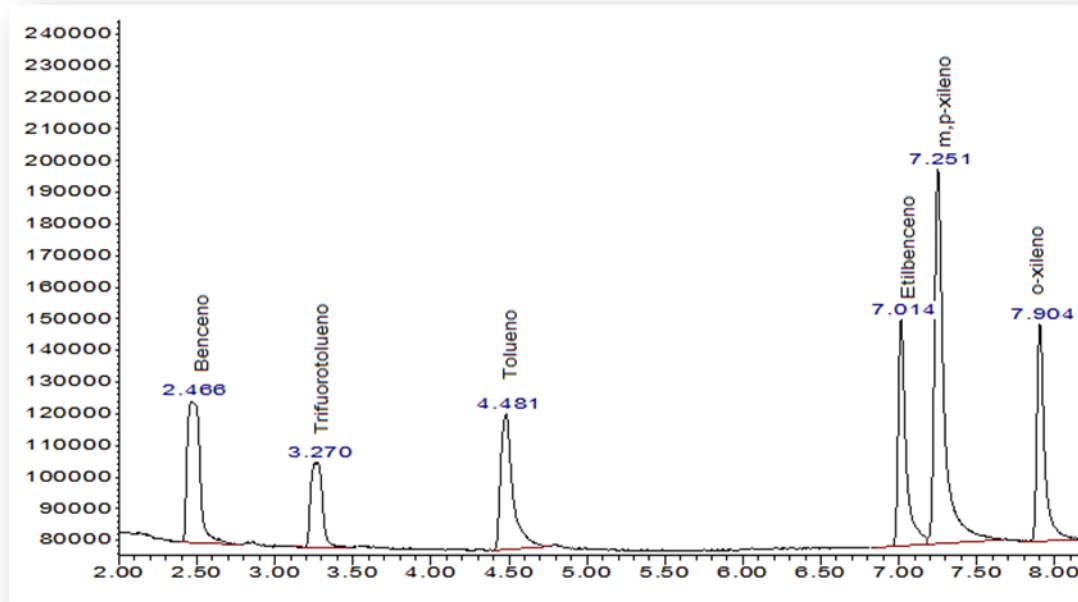
Para ello, es necesario “afinar” el proceso del método en todos sus apartados, prestando una especial consideración a los diversos parámetros instrumentales de aplicación, con el fin de garantizar que los resultados obtenidos sean los correspondientes a los compuestos a analizar y estén avalados por investigaciones previas que los certifiquen.

Las norma EPA 8015C <sup>(30)</sup>, en su sección 6.2 se presentan el conjunto de columnas recomendadas, específicamente la sección 6.2.4 corresponde con un tipo de columna equivalente a la empleada en el laboratorio de desechos tóxicos (ver **Tabla XIII**). Por otra parte, en la sección 11.2 se presentan las condiciones de operación sugeridas para las diferentes columnas listadas. En esta se sección se indica que se deben “...*Establecer la condiciones cromatográficas apropiadas para la columna que será utilizada y los analitos especificados...*”. Las mismas deben asegurar condiciones instrumentales para alcanzar la resolución y sensibilidad de los analitos de interés. En la **Tabla XIV** se presentan las condiciones *sugeridas* para una columna equivalente a la empleada en el laboratorio de desechos tóxicos.

**Tabla XIV.** Condiciones de operación recomendadas por el método EPA 8015C

<b>Columna</b>	<b>Modelo</b>	Columna capilar de sílica fundida químicamente enlazada con 5% de metil silicona (DB-5, SPB-5, RTx, o equivalente), 30-m x 0.53-mm ID, 1.5- $\mu$ m de espesor		
	<b>Temperatura del Inyector</b>	200°C		
	<b>Temperatura del Detector</b>	340°C		
	<b>Flujo de arrastre</b>	5-7 mL/min		
	<b>Flujo de compensación</b>	30 mL/min		
	<b>Gas de compensación o “make up” y de arrastre</b>	Helio		
<b>Horno</b>	<b>#</b>	<b>Rampas, °C/min</b>	<b>Temperatura, °C</b>	<b>Tiempo de calentamiento, min</b>
	0	-	45	1,0
	1	5	100	0
	2	8	275	5,0

Debido a que la columna empleada (ver **Tabla XIII**) es de un menor diámetro interno que la recomendada en la normativa; fue necesario la ejecución de una puesta a punto del instrumento para verificar que las condiciones empleadas son adecuadas para la aplicación deseada en término de resolución cromatográfica, resolución de los analitos y sensibilidad. En general, al ser una columna de menor diámetro interno, los flujos de los gases y las presiones de trabajo cambian. Además, fue necesario la optimización de parámetros como el tipo de inyección (“*Split/Splitless*”) y sus condiciones de trabajo, las cuales no son especificadas en la normativa EPA 8015C <sup>(30)</sup>. En la **Figura 7** se presenta un cromatograma característico en las condiciones de operación optimizadas presentadas en la **Tabla XIII**, donde se puede observar picos definidos de cada uno de los compuestos, alta amplitud de respuesta y ancho de banda pequeño.



**Figura 7.** Cromatograma característico del benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos y estándar interno para una patrón de concentración 0,05 ppm.

Se puede observar en el cromatograma de BTEX que cada uno de los compuestos salen en distintos tiempos de retención, siendo el orden de elución: benceno, estándar interno, tolueno, etilbenceno, m,p-xileno y o-xileno, cabe destacar que los isómeros meta y para xileno salen juntos porque su punto de ebullición son muy cercanos ( $139,12^{\circ}\text{C}$  y  $138,37^{\circ}\text{C}$  respectivamente), y no se cuenta con una columna selectiva para la separación de xilenos. En este caso al momento de cuantificar se cuenta como el doble de concentración para estos dos compuestos ya que al co-eluir los dos juntos la señal medida es la de la suma de los dos compuestos.

La resolución  $R_S$  obtenida con la columna y las condiciones de operación empleadas constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos y es calcula a través de la ecuación 19 <sup>(55)</sup>:

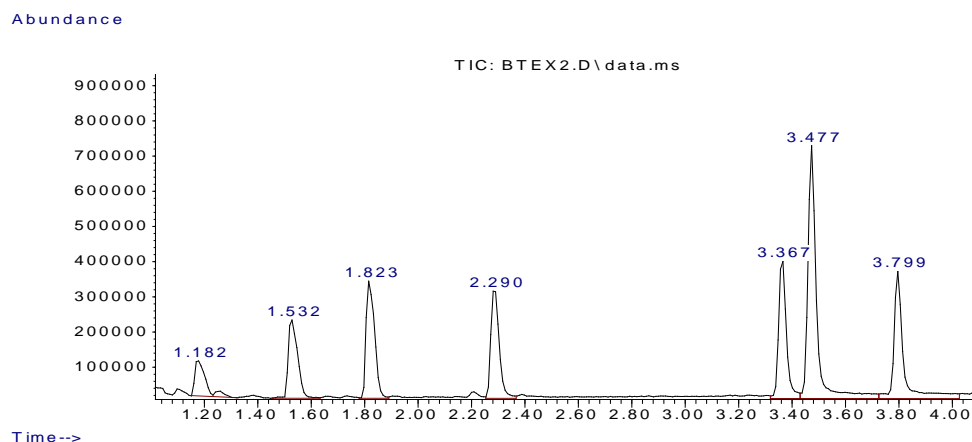
$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad \text{Ec ( 19 )}$$

Donde  $W_A$  y  $W_B$  son los anchos de banda y  $T_R$  los tiempos de retención de A y B respectivamente.

Debido a que esta toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, se puede afirmar que la magnitud de este valor permite asegurar la separación de dos picos. Estadísticamente se puede demostrar que una resolución de 1,5 permite una separación de los dos componentes, mientras que no es así para resoluciones  $< 0,75$ , por supuesto siempre y cuando las bandas sean gaussianas, es decir simétricas en ambos lados. Las resoluciones obtenidas para los componentes presentados en la **Figura 7** fueron en todos los casos mayores a 1,5; con la excepción del etilbenceno y el m,p xilenos, la cual se encuentra en  $0,86 \pm 0,03$ ; Sin embargo el mismo se encuentra por encima de 0,75.

En el caso de que exista un analito que se superponga en los tiempos de retención de los BTEX y se tenga duda sobre si es una interferencia o se trata de los compuestos evaluados el método EPA 8015C <sup>(30)</sup>; el laboratorio sigue la recomendación de realizar la evaluación de matrices complejas y/o con presencia de posibles interferencias a través de la normativa EPA 624 <sup>(31)</sup> para la determinación de compuestos orgánicos purgables por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

A continuación se presenta un cromatograma de BTEX obtenido de resultados históricos del laboratorio por cromatografía por espectrometría de masas, donde se muestran las masas principales de cada compuesto y sus tiempos de retención.



	Compuesto	t <sub>R</sub> (min)	Masa principal ión	Área	Concentración	unidades
1)	tri-F-tolueno	1,823	146	1493199	0,1	ppm
2)	mtbe	1,182	73	1798933	0,1	ppm
3)	Benceno	1,532	78	2641343	0,1	ppm
4)	Tolueno	2,290	91	2785540	0,1	ppm
5)	etilbenceno	3,367	91	3192993	0,1	ppm
6)	m,p-xileno	3,477	91	4968637	0,2	ppm
7)	o-xileno	3,799	91	2294254	0,1	ppm

Como se muestra en los resultados el orden de elución de cada uno de los compuesto es benceno, estándar interno, tolueno, etilbenceno, m,p-xileno (que eluyen juntos) y o-xileno; teniendo estos datos históricos en el laboratorio no fue necesario hacer el estudio de selectividad ya que sabe con un gran porcentaje de confiabilidad donde eluyen cada uno de los compuestos, además en publicaciones y trabajos relacionados con estos compuestos es muy bien estudiado las interferencias de cada uno en diferentes matrices por lo que no fue necesario hacer el estudio de selectividad en el proceso de validación.



Para seleccionar las condiciones empleadas en el LDT y durante el proceso de validación, se tomó como criterio las condiciones encontradas en la literatura usadas por algunos investigadores; en el caso del volumen de inyección Cavalcante y colaboradores<sup>(21)</sup> propone el uso entre 5 y 15 mL de inyección, en el caso del LDT según los datos históricos evaluados se encontró que para 6 mL de inyección se obtenían picos con buena resolución y alta amplitud por lo que este volumen fue seleccionado.

En el caso de modo de inyección se seleccionó el modo de inyección Split, el cual es el mayormente empleado en los estudios de BTEX presentados en la **Tabla VII**; en el modo Split solo una cierta cantidad de muestra de analito es inyectada a la columna ya que ésta se divide antes de entrar, una parte entra a la columna y la otra se expulsa a través de la válvula de venteo del “*Split*”. Este modo de inyección suele dar picos de cromatogramas mas estilizados y más limpios; esto es debido a que si en la muestra el analito es mayoritario el resto de componentes de la matriz (contaminantes, interferencias, etc.) se ven notablemente reducidos; a diferencia del modo “*splitless*” donde la mayoría de la muestra inyectada entra a la columna, recomendado para muestras diluidas o trazas.

### **SELECCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN**

Cuando un laboratorio decide implantar un Sistema de Gestión de la Calidad basado en la Norma ISO/IEC 17025, asume al mismo tiempo un conjunto de lineamientos establecidos en esta, los cuales le permiten adaptar sus procesos y procedimientos a estándares internacionales que conducen a un mejoramiento sistemático de sus actividades, lo cual redundará finalmente en la plena satisfacción del cliente.

En este grupo de lineamientos, la norma ISO establece en la Cláusula 5.4.2 párrafo 2, que el laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos o las calibraciones. Esto a su vez implica que debe recabarse evidencia objetiva para demostrar lo establecido en dicha cláusula.

Este proceso de validación utilizado rigurosamente para métodos no normalizados, adaptados o modificados, establece una metodología que puede ser utilizada como guía para realizar la confirmación necesaria y requerida por la ISO 17025 para los métodos normalizados, en este sentido, el LDT ha establecido una serie de objetivos de validación que permita la confirmación del desempeño técnico del laboratorio en la correcta aplicación los protocolos normalizados EPA 5021A <sup>(22)</sup> y 8015C <sup>(30)</sup> para la determinación de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en muestras de aguas por la extracción usando el análisis de vapor en equilibrio o “*Headspace*” y el análisis por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama. Con la finalidad de asegurar que el uso que hace de los ensayos es adecuado en cuanto a su alcance, intervalo de trabajo, linealidad, precisión y exactitud.

En la **Tabla XV** se listan los parámetros y objetivos de validación para la determinación de BTEX en muestras acuosas siguiendo las metodologías especificadas y de acuerdo a su alcance y sus objetivos. Los valores de los objetivos de validación para cada parámetro fueron obtenidos a partir de los criterios de aceptación aceptados en normas internacionales así como datos reportados en la literatura para estas metodologías.

**Tabla XV.** Parámetros y objetivos de Validación para la determinación de BTEX

<b>PARÁMETROS DE VALIDACIÓN</b>	<b>OBJETIVO</b>
<b>ALCANCE</b>	Determinación de BTEX en muestras acuosas por extracción usando el análisis de vapor en equilibrio o “ <i>Headspace</i> ” y análisis por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama
<b>INTERVALO DE TRABAJO</b>	0,05 a 0,15 µg/mL
<b>LINEALIDAD</b>	$m = \text{diferente de cero}$ $L_0 = \sim 0$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ $G_{\text{exp}} < G_{\text{TABLA}}$ $F_{1\text{exp}} > F_{1\text{TABLA}}$ $F_{2\text{exp}} < F_{2\text{TABLA}}$ $CV_f < 20\%$ $t_{s \text{ exp}} > t_{s \text{ TABLA}}$ $t_{s \text{ exp}} < t_{s \text{ TABLA}}$
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>	$LD \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>	$LC \leq 0,05 \mu\text{g/mL}$
<b>PRECISIÓN</b>	$CV \text{ de Repetibilidad} \leq 10\%$ $CV \text{ de Reproducibilidad} \leq 20\%$
<b>EXACTITUD</b>	Recuperaciones $\geq 80 \%$

Parámetros como la selectividad y robustez son fundamentalmente determinados en los procesos de validación de nuevas metodologías. Sin embargo, en el presente estudio las metodologías aplicadas son reconocidas por organismos de normalización<sup>(22, 27, 30)</sup> y ampliamente publicadas<sup>(1, 34, 45)</sup>, por lo que estos parámetros han sido ampliamente estudiadas. Adicionalmente, a través de análisis continuos de muestras de control en el laboratorio de desechos tóxicos es posible asegurar la robustez a través de sus resultados históricos.

## RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE BTEX

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los diferentes parámetros de validación de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en muestras de agua y su comparación con los criterios de aceptación.

### 1. LINEALIDAD

En la **Tabla XVI** se presenta el promedio correspondientes a las áreas corregidas con el estándar interno, es decir área del benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos entre área de estándar interno ( $Y_i$ ), obtenida de las 3 mediciones realizadas para cada nivel de concentración ( $X_i$ ) en condiciones de precisión intermedia. En cualquiera de los casos el coeficiente de variación se encontró entre 1-10%, para el intervalo de concentración estudiado.

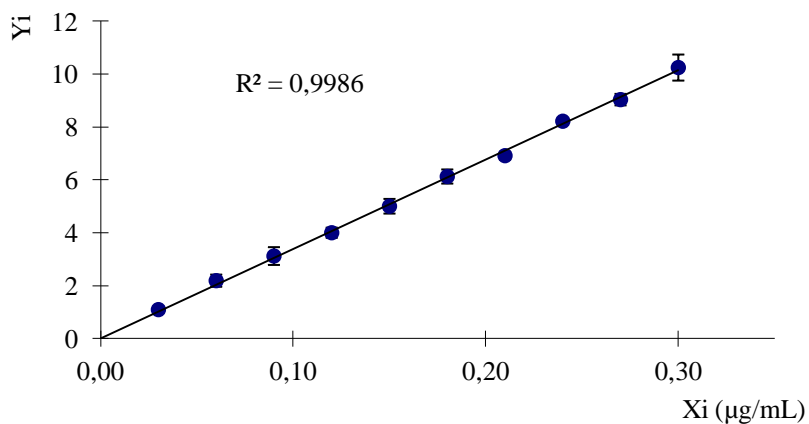
**Tabla XVI.** Resultados obtenidos para el estudio de linealidad en el benceno

$X_i$	Benceno		Tolueno		Etilbenceno		m,p-Xilenos <sup>2</sup>		o-Xilenos	
	$\bar{y}_j$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_j$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_j$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_j$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_j$	CV <sup>1</sup> ,%
<b>0,03</b>	1,10	1,8	0,69	5,8	0,67	4,5	1,32	3,8	0,65	4,6
<b>0,06</b>	2,20	10,5	1,39	7,2	1,26	6,3	2,52	7,1	1,31	8,4
<b>0,09</b>	3,13	10,9	2,15	9,8	1,92	9,9	3,79	7,9	1,82	8,8
<b>0,12</b>	4,01	4,7	2,76	7,6	2,57	3,9	5,07	2,6	2,47	6,9
<b>0,15</b>	5,01	5,6	3,39	3,5	3,27	2,8	6,59	1,5	3,15	1,3
<b>0,18</b>	6,14	4,4	4,14	1,2	3,88	2,1	7,75	2,6	3,72	1,9
<b>0,21</b>	6,92	2,2	4,97	3,6	4,72	2,1	9,07	4,2	4,38	5,5
<b>0,24</b>	8,23	1,2	5,57	0,5	5,3	3,6	10,58	3,4	5,00	2,0
<b>0,27</b>	9,04	2,4	6,28	8,0	5,95	4,4	11,6	3,1	5,71	6,3
<b>0,30</b>	10,26	4,8	6,62	3,5	6,31	2,4	12,57	4,4	5,81	5,5

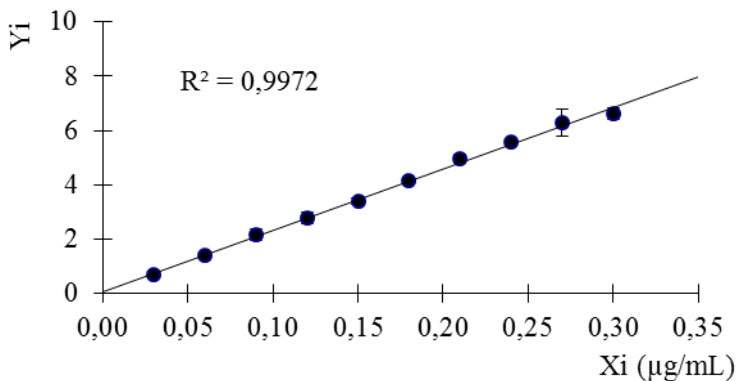
<sup>1</sup>Coeficiente de variación,  $CV = (Desviación\ Estandar / Promedio) * 100, \%$

<sup>2</sup> La concentración ( $X_i$ ) de los m,p Xilenos corresponde al doble que los presentado en la tabla.

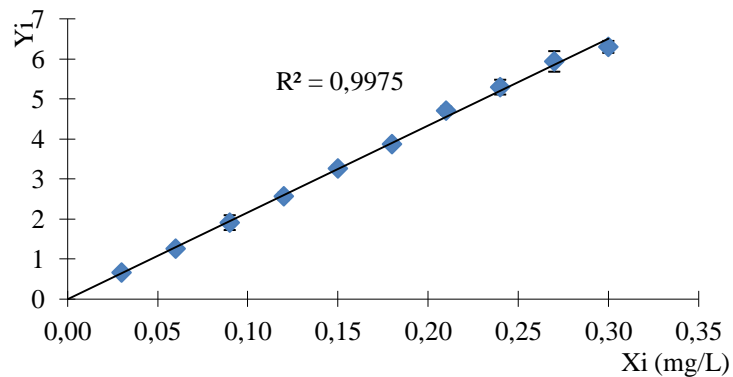
Por otra parte en desde la **Figura 8** hasta la **Figura 12** se presentan los gráficos de correlación lineal entre el área corregida con el estándar interno ( $Y_i$ ) del benceno, tolueno, etilbenceno, m,p-xilenos y o-xilenos vs su concentración, respectivamente. En cualquiera de los casos se verificó que los residuales presentaran un comportamiento aleatorio; así como se puede observar que en todos los casos el coeficiente de correlación se encontró  $>0,99$ .



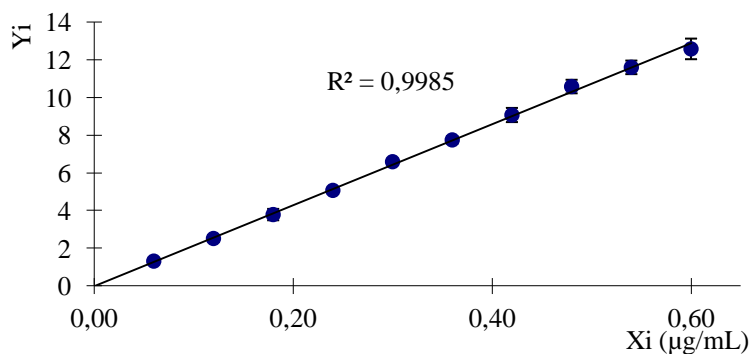
**Figura 8.** Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el benceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



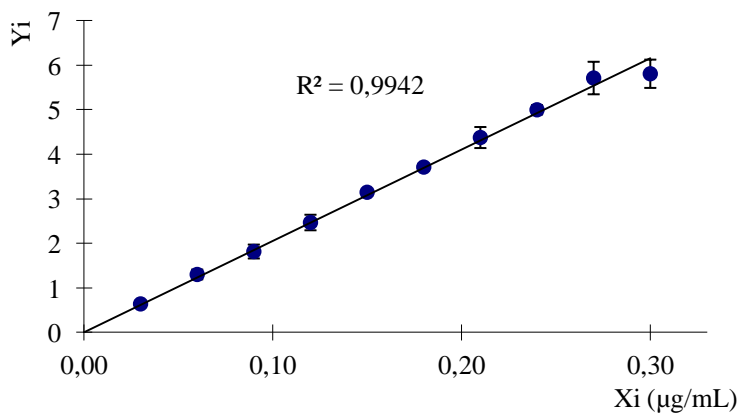
**Figura 9.** Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el tolueno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



**Figura 10.** Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el etilbenceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



**Figura 11.** Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el m,p-xileno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



**Figura 12.** Curva de regresión lineal para el estudio de linealidad en el o-xileno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)

Debido a que el estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística (ver sección 3.3 de marco teórico), en la **Tabla XVII** se presentan los valores obtenidos para cada parámetro evaluado en el análisis de BTEX e indicando los criterios de aceptación establecidos.

**Tabla XVII.** Resultados obtenidos para los parámetros evaluados en el estudio de la linealidad de la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.

<b>Parámetros → Criterio de aceptación</b>				
<b>Benceno</b>	<b>Tolueno</b>	<b>Etilbenceno</b>	<b>m,p-Xilenos</b>	<b>o-Xileno</b>
<b>Ordenada al origen (a) → ~ 0</b>				
0,084 ± 0,196	0,061 ± 0,169	-0,002 ± 0,123	0,023 ± 0,238	0,084 ± 0,169
<b>Pendiente (b) → pendiente diferente de cero</b>				
33,46 ± 1,05	22,63 ± 0,91	21,74 ± 0,66	21,40 ± 0,64	20,11 ± 0,91
<b>Coefficiente de correlación (r) → ≥ 0,99</b>				
0,9967	0,9947	0,9969	0,9970	0,9933
<b>Coefficiente de determinación (r<sup>2</sup>) → ≥ 0,98</b>				
0,9934	0,9893	0,9938	0,9941	0,9866
<b>Homogeneidad de las varianzas (Gexp) → &lt; 0,445</b>				
0,357	0,285	0,423	0,304	0,238
<b>Normalidad de los residuales → F<sub>1exp</sub> &gt; 2,393 &amp; F<sub>2exp</sub> &lt; 2,393</b>				
F <sub>1exp</sub> : 4220,5 F <sub>2exp</sub> : 0,559	F <sub>1exp</sub> : 2690,05 F <sub>2exp</sub> : 0,888	F <sub>1exp</sub> : 4513,00 F <sub>2exp</sub> : 1,653	F <sub>1exp</sub> : 4722,28 F <sub>2exp</sub> : 0,878	F <sub>1exp</sub> : 2056,19 F <sub>2exp</sub> : 1,582
<b>Variación del factor de respuesta → CV<sub>fr</sub> &lt; 20%</b>				
6,16 %	5,31%	4,42 %	4,19 %	5,71 %
<b>Significación estadística de la desviación estándar → t<sub>exp</sub> &gt; 2,048</b>				
64,97	50,96	67,18	68,72	45,35
<b>Test de proporcionalidad → t<sub>exp</sub> &lt; 2,048</b>				
0,876	0,739	0,026	0,195	1,02

Según los resultados obtenidos se puede observar que el valor de la ordenada en el origen ( $a$ ), para cada uno de los componentes estudiados (BTEX) es cercano a cero, esto se verifica con el test de proporcionalidad donde el  $t$  estadístico calculado al 95% de confianza es menor al valor tabulado, por tanto se puede afirmar que la ordenada o intercepto no es estadísticamente distinta de cero, es decir pasa por el origen.

Esto es corroborado al observar el intervalo de confianza  $a \pm t * S_a$  calculado para un 95% de confianza. En todos los casos, benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos el valor de cero se encuentra entre los límites máximos y mínimo, lo cual indica que la recta pasa por el origen. Esto implica que la aplicación de las metodologías no está afectada por errores sistemáticos por defecto o por exceso; principalmente en la preparación y análisis de patrones de calibración.

En relación con la pendiente, se cumple el criterio de aceptación de que la pendiente sea diferente de cero para todos los BTEX, esto también se puede verificar con la prueba de significancia estadística de la desviación estándar donde se calcula el  $t$  estadístico, debido a que este valor es mayor al teórico o tabulado se puede afirmar que la pendiente obtenida es diferente de cero con un nivel de confianza del 95%, para cada uno de los componentes (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos). El cálculo de la pendiente permite evaluar la sensibilidad del método, a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito).

Por otra parte, debido a que el  $G_{exp} < G_{tablas}$  se puede afirmar que las variancias de los diferentes niveles de concentración en relación con la regresión lineal son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. En relación con los valores obtenidos para estimar la normalidad de los residuales se



obtiene que el  $F_{1exp} > F_{1tablas}$  lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero. También se cumple que  $F_{2exp} < F_{2tablas}$  lo que demuestra que existe linealidad entre los resultados obtenidos.

Por otro lado se evaluó el coeficiente de correlación  $R$  el cual indica el grado de relación entre la variable  $x$  y la variable  $y$ , su máximo valor es 1, si  $R$  es cercano a la unidad significa que existe una correlación con una probabilidad elevada; sin embargo el cálculo de  $R$  es limitado y no justifica por sí solo la linealidad, siendo el coeficiente de determinación  $R^2$  el que aporta una mayor significancia estadística ya que expresa la proporción de la variación total de  $y$  explicada por el modelo. En los resultados se observa que  $R$  y  $R^2$  cumplen los criterios de aceptación ( $> 0,99$ ) para cada uno de los componentes (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos).

Finalmente, el factor de respuesta ( $f$ ) expresa la relación entre la lectura o respuesta (relación de área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de la calibración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. El método EPA 8015C describe que si el coeficiente de variación de respuesta es menor al 20% se puede asumir linealidad en el método evaluado, para cada uno de los componentes (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) el coeficiente de variación se encuentra entre 4-6 %. Por tanto, considerando cada una de las pruebas realizadas, se puede asumir linealidad en el método en el intervalo de concentraciones entre 0,05 a 0,30 mg/L de BTEX.

## 2. LÍMITES DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)

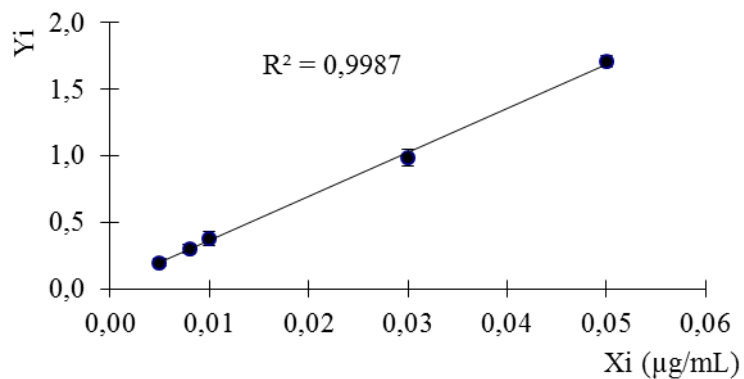
Para calcular los límites de detección y cuantificación se utilizó el método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado, empleada para los métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco, en la **Tabla XVIII** se presentan los resultados obtenidos para el intervalo de trabajo del método en patrones de calibración analizados por quintuplicados en condiciones de repetibilidad intermedia. Mientras que desde la **Figura 13** hasta **Figura 17** se muestran el gráfico de correlación lineal entre el área de los BTEX corregida con el estándar interno ( $Y_i$ ) vs su concentración.

**Tabla XVIII.** Resultados obtenidos en el estudio de límite de cuantificación y detección para la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.

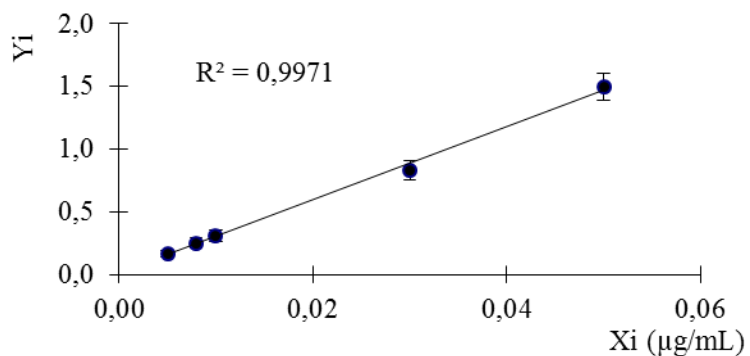
$X_i$	Benceno		Tolueno		Etilbenceno		m,p-Xilenos <sup>2</sup>		o-Xilenos	
	$\bar{y}_i$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_i$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_i$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_i$	CV <sup>1</sup> ,%	$\bar{y}_i$	CV <sup>1</sup> ,%
<b>0,005</b>	0,20	14,0	0,16	12,5	0,18	10,6	0,31	9,4	0,17	14,7
<b>0,008</b>	0,30	11,7	0,25	16,0	0,26	10,4	0,48	9,8	0,25	9,2
<b>0,010</b>	0,38	14,5	0,31	12,9	0,33	19,7	0,63	21,9	0,32	20,9
<b>0,030</b>	0,99	6,2	0,83	9,6	0,94	6,8	1,82	10,4	0,87	10,0
<b>0,050</b>	1,71	2,6	1,5	7,3	1,61	2,9	3,14	5,4	1,48	3,8

<sup>1</sup>Coeficiente de variación,  $CV = (Desviación\ Estandar/Promedio) * 100, \%$

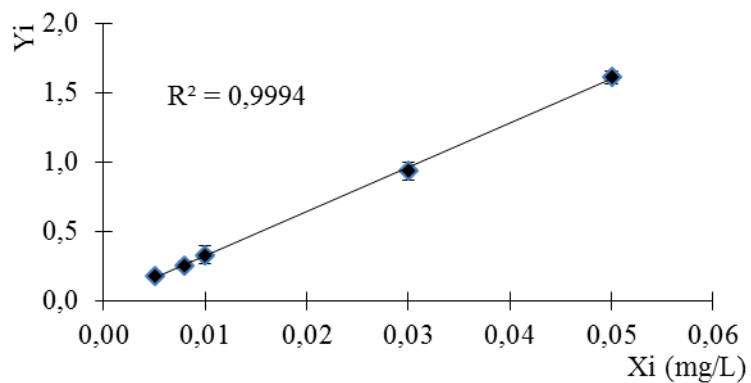
<sup>2</sup> La concentración ( $X_i$ ) de los m,p Xilenos corresponde al doble que los presentado en la tabla.



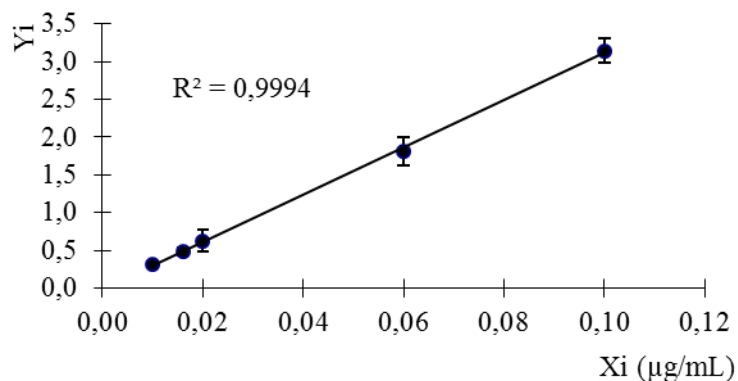
**Figura 13.** Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del benceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



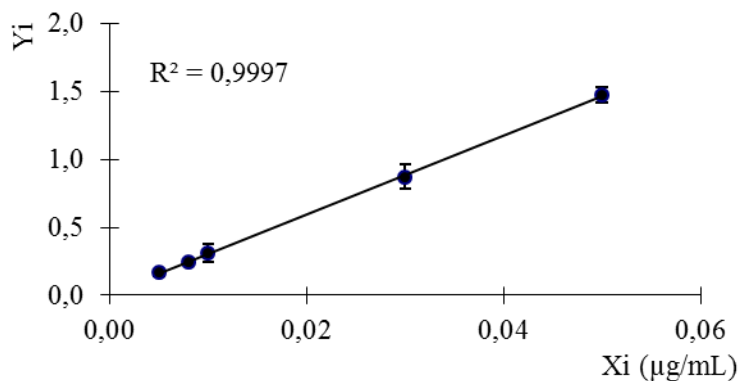
**Figura 14.** Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del tolueno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



**Figura 15.** Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del etilbenceno (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



**Figura 16.** Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del m,p-xilenos (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)



**Figura 17.** Regresión lineal para el estudio de límite de detección y cuantificación del o-xilenos (el error corresponde al intervalo de confianza de las réplicas)

Los resultados de los cálculos asociados a la determinación de los límites de detección y cuantificación se presentan en la **Tabla XIX**. En cualquiera de los casos se mantiene el cumplimiento de los criterios de linealidad y se puede observar que la cantidad mínima de benceno y etilbenceno a ser detectada por el método es de 0,004 µg/mL (4 ppb), mientras que para tolueno y o-xilenos es de 0,006-0,007 µg/mL (6-7 ppb), y para el m,p-xileno 0,012 µg/mL (12 ppb). Mientras que la cantidad mínima cuantificable con una adecuada precisión en el benceno y etilbenceno es de 0,015 µg/mL (15 ppb), mientras

que para tolueno y o-xilenos es de 0,020  $\mu\text{g/mL}$  (20 ppb), y para el m,p-xileno 0,040  $\mu\text{g/mL}$  (40 ppb), limites que se encuentran muy por debajo de los valores regulados en las diferentes calidades de aguas. Cumpliéndose en todos los casos los criterios y/o objetivos de validación de LD < 15 ppb y LC < 50 ppb.

**Tabla XIX.** Resultados obtenidos a partir de la curva de regresión de la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.

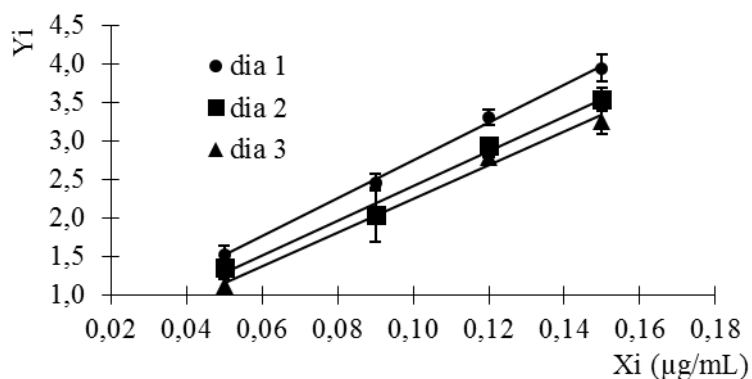
	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	m,p-Xilenos	o-Xilenos
<b>Pendiente:</b>	33,15 $\pm$ 1,16	29,26 $\pm$ 0,04	31,84 $\pm$ 0,03	31,35 $\pm$ 0,08	29,06 $\pm$ 0,03
<b>Intercepto:</b>	0,031 $\pm$ 0,031	0,008 $\pm$ 1,626	0,009 $\pm$ 1,133	-0,016 $\pm$ 1,520	0,017 $\pm$ 1,299
<b>r<sup>2</sup> :</b>	0,9935	0,9837	0,9932	0,9875	0,9894
<b>r :</b>	0,9967	0,9918	0,9966	0,9937	0,9947
<b>LD:</b>	0,004 $\mu\text{g/mL}$	0,007 $\mu\text{g/mL}$	0,004 $\mu\text{g/mL}$	0,012 $\mu\text{g/mL}$	0,006 $\mu\text{g/mL}$
<b>LC:</b>	0,014 $\mu\text{g/mL}$	0,023 $\mu\text{g/mL}$	0,015 $\mu\text{g/mL}$	0,040 $\mu\text{g/mL}$	0,019 $\mu\text{g/mL}$

### 3. PRECISIÓN

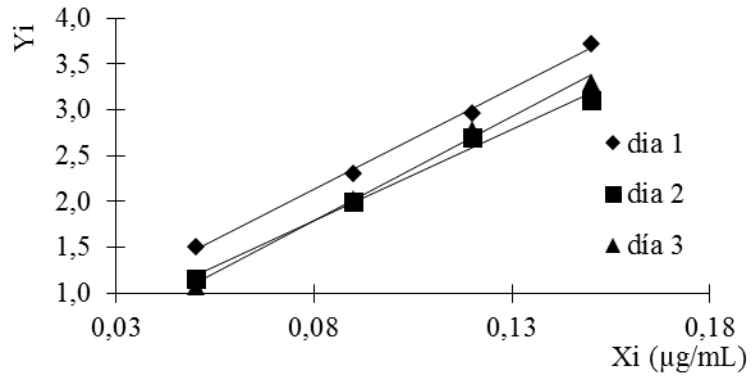
En la **Tabla XX** se presenta los resultados obtenidos de las curvas de calibración correspondientes al estudio de precisión, para cada uno de los componentes estudiados (BTEX). Las determinaciones fueron realizadas en condiciones de precisión intermedia a fin de evaluar el factor de respuesta del método. Las mismas corresponden a las curvas con las cuales se evaluaron los parámetros de precisión y exactitud para cada compuesto. Mientras que en la **Figura 18** se muestran el grafico de correlación lineal entre el área del benceno corregida con el estándar interno ( $Y_i$ ) vs su concentración, para cada una de las curvas de calibración obtenidas.

**Tabla XX.** Área corregida de los BTEX con el estándar interno para los diferentes patrones de calibración y días del experimento

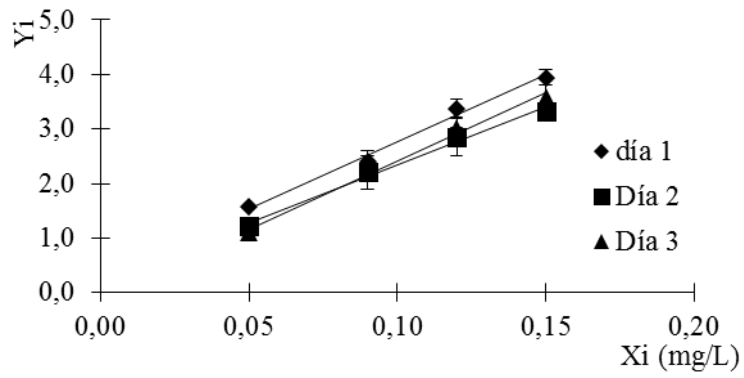
		Concentración, mg/L								R <sup>2</sup>	Pendiente	Intercepto
Dias		0,05	0,09	0,12	0,15							
Benceno	1	1,61	1,44	2,54	2,39	3,38	3,24	4,08	3,83	0,99	24, ± 3	0,29 ± 0,30
	2	1,36	1,35	1,80	2,29	2,97	2,93	3,44	3,65	0,96	23 ± 4	0,16 ± 0,48
	3	1,18	1,07	2,11	2,02	2,79	2,79	3,14	3,38	0,99	22 ± 3	0,08 ± 0,29
Tolueno	1	1,45	1,58	2,54	2,07	2,97	2,95	3,89	3,55	0,96	22 ± 4	0,38 ± 0,46
	2	1,17	1,15	1,76	2,25	2,51	2,90	3,12	3,09	0,95	20 ± 5	0,20 ± 0,56
	3	1,09	1,06	2,06	2,00	2,78	2,80	3,08	3,53	0,98	23 ± 4	-0,02 ± 0,38
Etilbenceno	1	1,57	1,56	2,55	2,27	3,49	3,24	4,05	3,85	0,98	24 ± 4	0,31 ± 0,39
	2	1,23	1,22	1,98	2,43	2,61	3,12	3,22	3,40	0,94	21 ± 5	0,24 ± 0,57
	3	1,18	1,04	2,20	2,17	3,00	3,03	3,33	3,85	0,97	25 ± 4	-0,11 ± 0,45
m,p-Xilenos	1	2,83	2,87	5,01	4,60	6,98	6,59	7,97	7,97	0,99	26 ± 6	0,22 ± 0,63
	2	2,32	2,15	4,07	4,87	5,34	6,23	6,56	6,93	0,95	23 ± 10	0,16 ± 1,11
	3	2,38	2,65	4,42	4,40	6,07	5,97	6,73	7,62	0,98	24 ± 7	0,18 ± 0,74
o-Xileno	1	1,27	1,41	2,33	2,14	3,23	2,98	3,70	3,64	0,99	24 ± 3	0,15 ± 0,32
	2	1,07	1,11	1,82	2,23	2,50	2,85	3,07	3,32	0,96	21 ± 4	0,08 ± 0,47
	3	1,09	1,04	2,04	1,98	2,75	2,72	3,11	3,60	0,98	23 ± 3	-0,07 ± 0,37



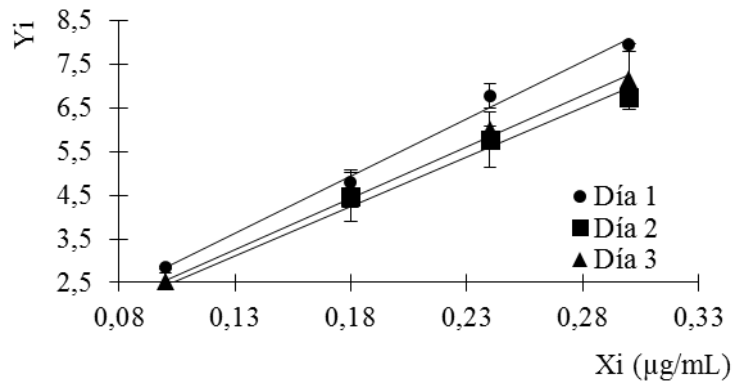
**Figura 18.** Curva de regresión lineal del benceno para diferentes días



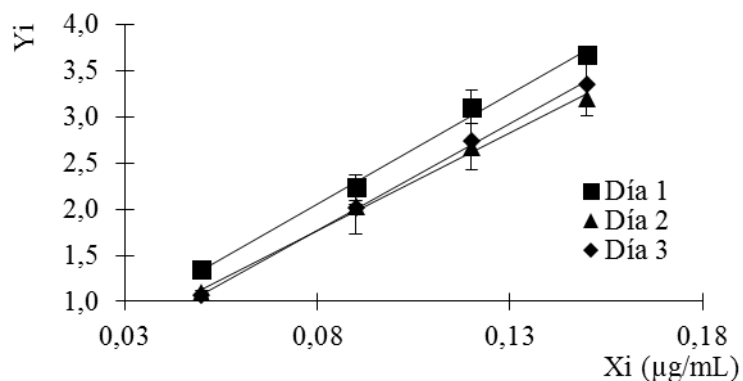
**Figura 19.** Curva de regresión lineal del tolueno para diferentes días



**Figura 20.** Curva de regresión lineal del benceno para diferentes días



**Figura 21.** Curva de regresión lineal del m,p-xileno para diferentes días

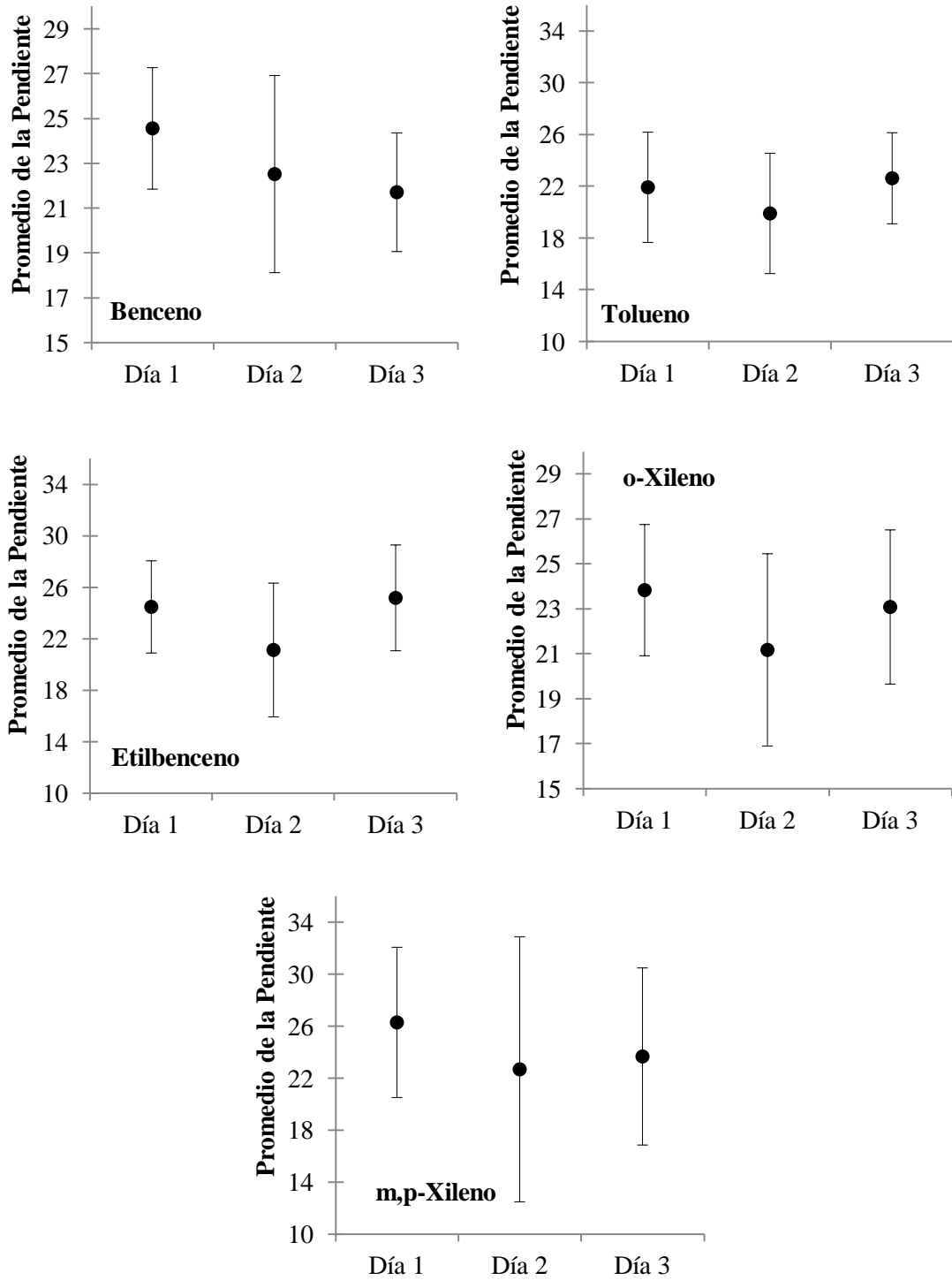


**Figura 22.** Curva de regresión lineal del o-xileno para diferentes días

Con la finalidad de evaluar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de las curvas de calibración ejecutadas en condiciones de precisión intermedia, se aplicó un análisis de varianza, comparando a través de la prueba estadística de Fisher las varianza entre y dentro de cada una de las curvas de calibrado. Según los resultados obtenidos por la prueba estadística de Fisher los  $F_{\text{calculados}}$  para cada uno de los BTEX fue menor al  $F_{\text{fisher}}$  o valor tabulado, por tanto se puede afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias o promedios de las pendientes con un nivel de confianza del 95%. Esto puede ser observado gráficamente en la **Figura 23** donde los diferentes intervalos de confianza de las pendientes obtenidas en diferentes días en condiciones de precisión intermedia se encuentran solapadas entre sí para cada uno de los componentes (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos).

En relación a los cálculos de precisión intermedia y repetibilidad del método, en la **Tabla XXI** se muestran los resultados obtenidos para los diferentes analistas y niveles de concentración de cada una de las muestras analizadas para los BTEX en condiciones de precisión intermedia; donde cada duplicados fue analizados en condiciones de repetibilidad.





**Figura 23.** Comparación de la pendiente de la ecuación de regresión lineal de los BTEX para evaluar muestras acuosas (El error corresponde al intervalo de confianza del promedio para un  $\alpha=0,05$ ).

**Tabla XXI.** Concentraciones obtenidas por cada analista en el estudio de precisión intermedia de la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.

	Concentración, mg/L	Analistas		
		1	2	3
Benceno	0,05	0,042	0,034	0,038
		0,050	0,055	0,036
	0,1	0,073	0,066	0,069
		0,066	0,068	0,069
	0,3	0,202	0,235	0,213
		0,204	0,198	0,202
Tolueno	0,05	0,052	0,035	0,036
		0,045	0,050	0,035
	0,1	0,075	0,071	0,058
		0,073	0,073	0,060
	0,3	0,199	0,203	0,216
		0,202	0,197	0,197
Etilbenceno	0,05	0,051	0,039	0,041
		0,048	0,047	0,039
	0,1	0,081	0,078	0,061
		0,074	0,087	0,066
	0,3	0,200	0,201	0,218
		0,206	0,204	0,207
Xilenos	0,05	0,039	0,022	0,029
		0,032	0,043	0,029
	0,1	0,055	0,056	0,053
		0,052	0,057	0,049
	0,3	0,207	0,178	0,170
		0,166	0,157	0,164

Con la finalidad de realizar el análisis de varianza para determinar los límites de precisión intermedia y repetibilidad, se realizaron las evaluaciones de datos extremos a través de la prueba de Grubb y prueba de Dixon; así como la prueba de Cochran con el fin de asegurar que las varianzas son homogéneas. En cualquier de los casos, los resultados obtenidos de los diferentes estadísticos de pruebas y sus correspondientes

valores críticos o tabulados se presentan en las **Tabla XXII**, **Tabla XXIII** y **Tabla XXIV**, para las muestras con niveles de concentración de 0,05; 0,10 y 0,30 mg/L, respectivamente.

La prueba de Dixon utiliza relaciones de los espacios entre datos de diferentes modos según la cantidad de valores en el grupo de datos. Este valor se compara con un valor crítico de una tabla para un nivel de confianza del 5%, y el valor se declara valor atípico si supera ese valor crítico. En cualquiera de los niveles de concentración estudiados se observó la presencia de valores extremos por la aplicación de esta prueba; con la única excepción del tolueno y etilbenceno para el nivel más bajo de concentración (0,05 mg/L).

**Tabla XXII.** Pruebas de contraste para el rechazo de valores extremos (prueba de Grubb y Dixon) y prueba de comparación de un grupo de varianzas (prueba de Cochran) para la muestra de 0,05 mg/L.

	<b>Benceno</b>	<b>Tolueno</b>	<b>Etilbenceno</b>	<b>Xilenos</b>
<b>G<sub>exp</sub></b>	1,510	1,264	1,292	1,439
<b>G<sub>5%</sub></b>	1,155	1,155	1,155	1,155
<b>G<sub>1%</sub></b>	1,155	1,155	1,155	1,155
<b>Prueba de Grubb Máximos</b>	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo
<b>Prueba de Grubb Mínimos</b>	No extremo	No extremo	No extremo	No extremo
<b>Q<sub>exp</sub></b>	0,763	0,460	0,416	0,770
<b>C<sub>crítico</sub></b>	0,560	0,560	0,560	0,560
<b>Prueba de Dixon</b>	Valor extremo	No extremo	No extremo	Valor extremo
<b>C<sub>exp</sub></b>	0,858	0,802	0,836	0,897
<b>C<sub>1%</sub></b>	0,993	0,993	0,993	0,993
<b>C<sub>5%</sub></b>	0,967	0,967	0,967	0,967
<b>Prueba de Cochran</b>	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo

**Tabla XXIII.** Pruebas de contraste para el rechazo de valores extremos (prueba de Grubb y Dixon) y prueba de comparación de un grupo de varianzas (prueba de Cochran) para la muestra de 0,10 mg/L.

	<b>Benceno</b>	<b>Tolueno</b>	<b>Etilbenceno</b>	<b>Xilenos</b>
<b>G<sub>exp</sub></b>	1,725	1,387	1,433	1,581
<b>G<sub>5%</sub></b>	1,155	1,155	1,155	1,155
<b>G<sub>1%</sub></b>	1,155	1,155	1,155	1,155
<b>Prueba de Grubb Máximos</b>	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo
<b>Prueba de Grubb Mínimos</b>	Valor extremo	No extremo	No extremo	Valor extremo
<b>Q<sub>exp</sub></b>	0,859	0,925	0,773	0,674
<b>C<sub>crítico</sub></b>	0,560	0,560	0,560	0,560
<b>Prueba de Dixon</b>	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo
<b>C<sub>exp</sub></b>	0,919	0,443	0,523	0,581
<b>C<sub>1%</sub></b>	0,993	0,993	0,993	0,993
<b>C<sub>5%</sub></b>	0,967	0,967	0,967	0,967
<b>Prueba de Cochran</b>	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo

De igual manera, en la aplicación de la prueba de Grubbs, la cual utiliza un estadístico de prueba, T (la diferencia absoluta entre el valor atípico,  $X_0$ , y el promedio de la muestra  $\bar{X}$  dividida por la desviación estándar de la muestra, s); al compararlo con el estadístico crítico o tabulado se tiene que para los tres niveles de concentración existen valores extremos o atípicos máximos y mínimos. Con la excepción de 0,05 mg/L donde el valor mínimo no es extremo para ninguno de los BTEX, y para 0,10 mg/L para tolueno y el etilbenceno.

La existencia de valores extremos en cualquiera de las pruebas aplicada puede ser debida a la presencia de un error sistemático (sesgo) el cual se puede atribuir a la inyección de la muestra, ya que por tratarse de una inyección manual la inyección entre

una muestra y otra varía mucho dependiendo de la pericia del analista. Así como del proceso de extracción por equilibrio en fase de vapor o “*headspace*” estático, ya que se puede observar que a mayor concentración mayor presencia de datos extremos.

**Tabla XXIV.** Pruebas de contraste para el rechazo de valores extremos (prueba de Grubb y Dixon) y prueba de comparación de un grupo de varianzas (prueba de Cochran) para la muestra de 0,30 mg/L.

	<b>Benceno</b>	<b>Tolueno</b>	<b>Etilbenceno</b>	<b>Xilenos</b>
<b>G<sub>exp</sub></b>	1,893	1,902	1,836	1,875
<b>G<sub>5%</sub></b>	1,155	1,155	1,155	1,155
<b>G<sub>1%</sub></b>	1,155	1,155	1,155	1,155
<b>Prueba de Grubb Máximos</b>	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo
<b>Prueba de Grubb Mínimos</b>	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo
<b>Q<sub>exp</sub></b>	0,928	0,806	0,825	0,886
<b>C<sub>crítico</sub></b>	0,560	0,560	0,560	0,560
<b>Prueba de Dixon</b>	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo	Valor extremo
<b>C<sub>exp</sub></b>	0,908	0,871	0,708	0,777
<b>C<sub>1%</sub></b>	0,993	0,993	0,993	0,993
<b>C<sub>5%</sub></b>	0,967	0,967	0,967	0,967
<b>Prueba de Cochran</b>	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo

Para el caso de la prueba de Cochran se tiene que el valor calculado es menor al valor tabulado o crítico, tanto para una confianza del 1% o 5%; por tanto se puede afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estudiadas en el diseño experimental, es decir, las varianzas son homogéneas; para todos los componentes (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y niveles de concentración estudiados.

Finalmente en la **Tabla XXV** se presentan los resultados obtenidos del ejercicio de validación, con todos los datos evaluados; es decir sin descartar ningún dato extremo debido al número limitado de los mismos. Sin embargo, se recomienda aplicar nuevamente el experimento luego de realizar acciones como: un re-entrenamiento del personal en los procesos asociados a la aplicación de las metodologías <sup>(22, 30)</sup>, la adquisición de sistemas automatizados de “*headspace*” y la disponibilidad de patrones certificados a diferentes niveles de concentración de BTEX. De los resultados obtenidos se puede concluir que en todos los niveles de concentración se cumplen con los criterios de precisión establecidos (precisión intermedia y repetibilidad), con la excepción de nivel de 0,05 mg/L para benceno, tolueno y xilenos cuyo coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad se encontró >10%.

**Tabla XXV.** Resultados de precisión intermedia y repetibilidad en la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.

	Concentración, mg/L	S <sub>r</sub>	S <sub>R</sub>	r	R	%CV <sub>r</sub>	%CV <sub>R</sub>
<b>Benceno</b>	<b>0,05</b>	0,0082	0,0092	0,0255	0,0226	<b>16,4</b>	18,4
	<b>0,10</b>	0,0031	0,0025	0,0086	0,0069	3,1	2,5
	<b>0,30</b>	0,0156	0,0130	0,0433	0,0361	5,2	4,3
<b>Tolueno</b>	<b>0,05</b>	0,0069	0,0082	0,0192	0,0227	<b>13,9</b>	16,4
	<b>0,10</b>	0,0014	0,0082	0,0040	0,0228	1,4	8,2
	<b>0,30</b>	0,0081	0,0068	0,0225	0,0188	2,7	2,3
<b>Etilbenceno</b>	<b>0,05</b>	0,0035	0,0053	0,0098	0,0148	7,0	10,6
	<b>0,10</b>	0,0061	0,0108	0,0170	0,0298	6,1	10,8
	<b>0,30</b>	0,0051	0,0067	0,0142	0,0184	1,7	2,2
<b>Xilenos</b>	<b>0,05</b>	0,0091	0,0073	0,0252	0,0203	<b>18,2</b>	14,6
	<b>0,10</b>	0,0022	0,0031	0,0062	0,0087	2,2	3,1
	<b>0,30</b>	0,0192	0,0175	0,0532	0,0485	6,4	5,8

#### 4. EXACTITUD

En la **Tabla XXVI** se presentan los resultados obtenidos del estudio de recuperación en muestras dopadas a tres niveles de concentración y analizadas en condiciones de precisión intermedia.

**Tabla XXVI.** Porcentaje de recuperación en la determinación de BTEX para evaluar muestras acuosas.

	Concentración, mg/L	Analistas			Promedio	CV, %
		1	2	3		
<b>Benceno</b>	<b>0,05</b>	<b>91,9</b>	<b>89,5</b>	<b>73,8</b>	<b>85,1</b>	<b>11,6</b>
	<b>0,10</b>	69,4	67,1	68,9	68,5	1,8
	<b>0,30</b>	67,7	72,2	69,2	69,7	3,3
<b>Tolueno</b>	<b>0,05</b>	<b>96,9</b>	<b>85,1</b>	<b>70,8</b>	<b>84,3</b>	<b>15,5</b>
	<b>0,10</b>	73,7	72,4	58,9	68,3	12,0
	<b>0,30</b>	66,9	66,7	68,9	67,5	1,8
<b>Etilbenceno</b>	<b>0,05</b>	<b>98,7</b>	<b>85,7</b>	<b>80,4</b>	<b>88,3</b>	<b>10,7</b>
	<b>0,10</b>	77,3	82,6	63,5	74,5	13,2
	<b>0,30</b>	67,7	67,5	70,8	68,7	2,7
<b>Xilenos</b>	<b>0,05</b>	<b>71,1</b>	<b>65,8</b>	<b>57,0</b>	<b>64,6</b>	<b>11,0</b>
	<b>0,10</b>	53,4	56,4	51,0	53,6	5,0
	<b>0,30</b>	62,1	55,8	55,6	57,8	6,4

Según los resultados obtenidos se observa que solo se cumple el criterio de aceptación de  $\%R \geq 80 \%$  para benceno, tolueno y etilbenceno en el nivel 1 donde la concentración es 0,05 ppm.

Esto se debe al hecho de que a mayor concentración hay mayor cantidad de solvente en la muestra por lo que existe una competencia significativa entre la presión de vapor

del analito y la presión de vapor del solvente al momento de evaporarse la muestra lo que hace que la muestra no se volatilice completamente y se generen pérdidas al momento de medirla. Estas dificultades pueden estar asociadas a la instrumentación manual empleada en el proceso de generación del “*headspace*” o vapor en fase de equilibrio, la cual requiere de una alta pericia de los analistas para asegurar condiciones reproducibles. Por tanto, una de las recomendaciones está asociada a la adquisición de un sistema automatizado.


Por otra parte, el nivel más alto de concentración de la muestra se encuentra fuera de la curva de calibración con la que se determinó por lo que genera un error adicional al momento de cuantificar. Es recomendable realizar procesos de dilución aplicables con la finalidad de evaluar las muestras dentro de los niveles de concentración de la curva de calibración.

Finalmente, debido a las dificultades en la preparación de las muestras dopadas con los componentes de interés (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno); asociadas principalmente a los procesos de evaporación de los compuestos orgánicos volátiles durante su manipulación y a los errores debido a las diluciones en serie que son requeridas; es altamente recomendado la adquisición de materiales de referencia certificados a diferentes niveles de concentración.

En cualquiera de los componentes de interés (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) no fue posible alcanzar los objetivos o criterios de validación establecidos. Por tanto, una vez ejecutadas las acciones recomendadas, es necesario realizar nuevamente el ejercicio de validación para la exactitud.



## DECLARACIÓN DE LA VALIDACIÓN

	Registro de Datos y Resultados Declaración/ Observación del Desempeño del Laboratorio
---	--

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	Determinación de BTEX en aguas por Cromatografía de Gases acoplada a detector de llama (GC/FID)
-------------------------	---

PARAMETROS DE VALIDACIÓN	OBJETIVO	RESULTADO
ALCANCE	Validación de BTEX en muestras acuosas por cromatografía de gases acoplada a detector de llama	No conforme
INTERVALO DE TRABAJO	0,05 A 0,15 µg/mL	Se evaluaron muestras entre 0,05 y 0,30 µg/mL
LINEALIDAD	m = diferente de cero $L_0 \sim 0$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ $G_{exp} < G_{TABLA}$ $F_{1exp} > F_{1TABLA}$ $F_{2exp} < F_{2TABLA}$ $CV_f < 20\%$ $t_{s\ exp} > t_{s\ TABLA}$ $t_{s\ exp} < t_{s\ TABLA}$	Se cumplieron todos los criterios de aceptación para cada parámetro evaluado en cada compuesto medido
LÍMITE DE DETECCIÓN	$LD \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$	0,004 a 0,012 µg/mL
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	$LC \leq 0,05 \mu\text{g/mL}$	0,014 a 0,040 µg/mL
PRECISIÓN	CV de Repetibilidad $\leq 10\%$ CV de Reproducibilidad $\leq 20\%$	No conforme para benceno, tolueno y xilenos a 0,05 µg/mL Conforme para todos los niveles (0,05; 0,10 y 0,30 µg/mL)
EXACTITUD	Recuperaciones $\geq 80\%$	No conforme

### DECLARACIÓN / OBSERVACIÓN

Es requerida una nueva evaluación para superar las no conformidades obtenidas, cuando se cumplan las acciones de re-entrenamiento del personal en los procesos asociados a la aplicación de las metodologías, la adquisición de sistemas automatizados de "headspace" y la disponibilidad de patrones certificados a diferentes niveles de concentración de BTEX.

**NOTA:**

LOS REGISTROS CON LOS DATOS Y RESULTADOS QUE SOPORTAN LA VALIDACIÓN DE ESTE PROCEDIMIENTO ANALÍTICO ESTAN DISPONIBLES EN EL SISTEMA DE DOCUMENTACIÓN DEL LABORATORIO

APROBADO POR			
NOMBRE	FIRMA	FECHA	CARGO

## CONCLUSIONES

Los límites de detección y cuantificación de los compuestos evaluados dieron resultados por debajo del criterio de aceptación, por lo que se concluye que el método puede ser evaluado para niveles bajos de concentración.

En el caso de la linealidad se encontraron coeficientes de determinación mayores a 0,98, cumpliéndose así la especificación de este parámetro para cada compuesto evaluado, además se realizaron pruebas estadísticas como la prueba t de Student para la verificación de la pendiente y el test de proporcionalidad; así como el análisis de varianza de la regresión lineal obteniendo las condiciones esperadas, dando como resultado que el método evaluado es lineal en el rango establecido.

En el estudio de precisión los resultados obtenidos para cada compuesto evaluado demostraron el cumplimiento de los objetivos o criterios de validación para el coeficiente de variación de la precisión intermedia; encontrándose conforme ( $< 20\%$ ) para todos los niveles de concentración estudiados (0,05; 0,10 y 0,30 mg/L). Mientras que para el coeficiente de variación de la repetibilidad los criterios de validación no fueron alcanzados solo para el benceno, tolueno y xilenos a 0,05 mg/L

La exactitud para todos los compuestos cumple el criterio de aceptación solo para el primer nivel de concentración de 0,05 mg/L, para los demás niveles no se cumple este criterio por lo que la exactitud del método no se puede confirmar.

Se consiguieron inconformidades en el proceso de validación por lo que no se logro la optimización completa del método.

## RECOMENDACIONES

A pesar de que se obtuvieron resultados dentro de los niveles de aceptación se recomienda adquirir un sistema de inyección automático para “*headspace*” ya que esto reduciría notablemente el tiempo de trabajo y disminuiría algunos errores sistemáticos que se cometen al momento de realizar la inyección manual.

En los resultados obtenidos se puede observar que para el cálculo de valores extremos la mayoría de los datos son valores extremos o atípicos, esto es debido a que se tienen pocos datos del análisis ya que se realizaron las mediciones por duplicado, por lo que se recomienda que para una próxima evaluación las mediciones se hagan con una mayor cantidad de medidas para así disminuir este efecto y tener mejores resultados.

La evaluación del parámetro de exactitud se hizo con una mezcla preparada de BTEX a partir de solventes puros, al realizar la preparación de este patrón por tener que ser manipulada varias veces entre diluciones se generaron pérdidas de los analitos. Es por esto que se recomienda utilizar un material de referencia certificado de BTEX a diferentes niveles de concentración.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Sarafraz-Yazdi A, Es' hagh Z, Sepehr S. Comparative study of the three sol-gel based solid phase microextraction fibers in extraction of BTEX from water samples using gas chromatography-flame ionization detection. *Analytical Methods*. 2010;2(6):746-52.
- 2 Zhang C. *Fundamentals of environmental sampling and analysis*: John Wiley & Sons; 2007.
- 3 Weninger S. *Química Orgánica*. Barcelona: Reverté S.A; 1988.
- 4 Sacks O. *CRC handbook of chemistry and physics*. New York: Advisory Board; 2003.
- 5 Yúfera EP. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Barcelona: Reverté; 1996.
- 6 Amor Cambon LM. *Eliminación biológica de compuestos monoaromáticos en presencia de metales pesados [tesis doctoral]*2007.
- 7 ATSDR, Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. Resumen de salud pública. Benceno CAS N° 71-43-2 2007 [Consultada en 2014 Nov]. Disponible en: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs3.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs3.pdf).
- 8 Wilbur SB, Keith S, Faroon O, Wohlers D. Toxicological profile for benzene [Agency for Toxic Substances and Disease Registry]. 2007 [Consultada en 2014 Nov]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.pdf>.
- 9 ATSDR, Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. Resumen de salud pública, Tolueno CAS N° 108-88-3 2000 [Consultada en 2014 Nov]. Disponible en: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs56.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs56.pdf).
- 10 ATSDR, Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. Resumen de salud pública, Etilbenceno 2010 [Consultada en 2014 Nov]. Disponible en: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs110.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs110.pdf).

- 11 ATSDR, Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. Resumen de salud pública, Xileno CAS N° 1330-20-7 2007 [Consultada en 2014 Nov]. Disponible en: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs71.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs71.pdf).
- 12 Agency UEP. Drinking water contaminants. Available from: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.
- 13 EURACHEM. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para Validación de Métodos y Tópicos relacionados. México: EURACHEM; 1998.
- 14 Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos, Gaceta Oficial Extraordinaria N°5.245 (1998).
- 15 Sarafraz-Yazdi A, Amiri A, Rounaghi G, Hosseini HE. A novel solid-phase microextraction using coated fiber based sol-gel technique using poly (ethylene glycol) grafted multi-walled carbon nanotubes for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples with gas chromatography-flam ionization detector. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(34):5757-64.
- 16 ISO/IEC 17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, (2005).
- 17 EPA METHOD 3511. Organic compounds in water by microextraction. 2002. Rev 0. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA
- 18 EPA METHOD 5030C. Purge and trap for aqueous samples. 2003. Rev 3. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA
- 19 EPA METHOD 5032 Volatile organic compounds by vacuum distillation. 1996. Rev 0. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA
- 20 EPA METHOD 3510C. Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. 1996. Rev 3. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA
- 21 EPA METHOD 3520C. Continuous Liquid-Liquid Extraction. 1996. Rev 3. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA

- 22 EPA METHOD 5021A. Volatile organic compounds in various sample matrices using equilibrium headspace analysis. 2003. Rev 1. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA
- 23 ISO 15680. Water quality - Gas-chromatographic determination of a number of monocyclic aromatic hydrocarbons, naphthalene and several chlorinated compounds using purge-and-trap and thermal desorption. 2003. publicado en ISO/TC 147/SC 2 Physical, chemical and biochemical methods por International Organization for Standardization
- 24 ASTM D5241. Standard Practice for Micro-Extraction of Water for Analysis of Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds in Water. 2011. publicado en Book of Standards Vol 11.02 por ASTM International
- 25 ASTM D5790. Standard Test Method for Measurement of Purgeable Organic Compounds in Water by Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 2012. publicado en Book of Standards Vol 11.02 por ASTM International
- 26 ASTM D2908. Standard Practice for Measuring Volatile Organic Matter in Water by Aqueous-Injection Gas Chromatography. 2011. publicado en Book of Standards Vol 11.02 por ASTM International
- 27 ASTM D3871. Standard Test Method for Purgeable Organic Compounds in Water Using Headspace Sampling. 2011. publicado en Book of Standards Vol 11.02 por ASTM International
- 28 ASTM D6520. Standard Practice for the Solid Phase Micro Extraction (SPME) of Water and its Headspace for the Analysis of Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds. 2012. publicado en Book of Standards Vol 11.02 por ASTM International
- 29 EPA METHOD 8021B Aromatic and Halogenated Volatiles by Gas Chromatography Using Photoionization and/or Electrolytic Conductivity Detectors. 1996. Rev 2. publicado en SW-846 Ch 4.3.1 por US EPA

- 30 EPA METHOD 8015C. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. 2007. Rev 3. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA
- 31 EPA METHOD 624. Measurement of purgable organic compounds water by purge and trap. 1996. publicado en APPENDIX A - PART 136 Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater por US EPA
- 32 EPA METHOD 502.2. VOCs in water by purge and trap capillary columns GC-PID and ECD. 1995. Rev 2.1. publicado en EPA-600/4-88/039. Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water. por US EPA
- 33 EPA METHOD 524.2. Measurement of purgable organic compounds in water by capillary column GCMS. 1995. Rev 4.1. publicado en EPA-600/4-88/039. Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water. por US EPA
- 34 Flórez Menéndez JC, Fernández Sánchez ML, Sánchez Uría JE, Fernández Martínez E, Sanz-Medel A. Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2000;415(1-2):9-20.
- 35 Penton Z. Optimization of conditions in static headspace GC. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1992;15(12):834-6.
- 36 Voice TC, Kolb B. Comparison of European and American Techniques for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Environmental Matrices. *Journal of Chromatographic Science*. 1994;32(8):306-11.
- 37 Hewitt AD. Comparison of Sample Preparation Methods for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Soil Samples: Solvent Extraction vs Vapor Partitioning. *Environmental Science & Technology*. 1998;32(1):143-9.
- 38 Wilson I AE, Cooke M, Poole CF. *Encyclopedia of Separation Science*: ACADEMIC PressINC; 2000.
- 39 Grob RL, Barry EF. *Modern practice of gas chromatography*. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2004.

- 40 Cavalcante RM, de Andrade MV, Marins RV, Oliveira LD. Development of a headspace-gas chromatography (HS-GC-PID-FID) method for the determination of VOCs in environmental aqueous matrices: Optimization, verification and elimination of matrix effect and VOC distribution on the Fortaleza Coast, Brazil. *Microchemical Journal*. 2010;96(2):337-43.
- 41 Demeestere K, Dewulf J, De Witte B, Van Langenhove H. Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices. *Journal of Chromatography A*. 2007;1153(1-2):130-44.
- 42 D. N. Environmental site characterization and ground-water monitorin. 2da ed. Boca Raton Fl: Taylor & Francis Group; 2006.
- 43 Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. 5ta ed. Madrid: McGraw-Hill 2001.
- 44 Sarafraz-Yazdi A, Amiri A, Es'haghi Z. Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector. *Talanta*. 2009;78(3):936-41.
- 45 Assadi Y, Ahmadi F, Hossieni MRM. Determination of btex compounds by dispersive liquid-liquid microextraction with GC-FID. *Chromatographia*. 2010;71(11-12):1137-41.
- 46 Chan CC, Lam H, Lee Y, Zhang X-M. Analytical method validation and instrument performance verification. Canada: Jhon Wiley & Sons; 2004.
- 47 Huber L. Validation and qualification in analytical laboratories. 2da ed. New York: Informa Healthcare 2007.
- 48 Haider SI. Validation Standard Operating Procedures: A Step by Step Guide for Achieving Compliance in the Pharmaceutical, Medical Device, and Biotech Industries. 2da ed. Boca Ratón, Fl: Taylor & Francis; 2006.
- 49 Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación, (1998).



- 50 Robert A. Nash AHW. Pharmaceutical Process Validation: An International. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2003.
- 51 Aguirre L, Garcia F, García T, Illera M, Juncadella M, Lizondo M, et al. Validación de métodos analíticos. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI); 2001.
- 52 Miller NJ, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta ed. Edición Madrid: Pearson Educación, SA. 2002.
- 53 ISO 5725-2. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results, Part 2: Methods for the Determination of Repeatability and Reproducibility. 1994. publicado en International Organization for Standardization por Standardization IOF
- 54 COVENIN 2972-1:1996 (ISO 5725-1:1994): Exactitud (Veracidad y Precisión) de métodos de medición y resultados. Parte 1: Principios y definiciones generales, (1996).
- 55 Rubinson KA, Rubinson JF. Análisis instrumental: Pearson educación, SA; 2000.

## ANEXO

# INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE BTEX EN MUESTRAS ACUOSAS

 <b>UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR</b>  <b>SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD DEL LABORATORIO</b>  D-RT-VDM-BTEX  <b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN DETERMINACIÓN DE BTEX EN MUESTRAS ACUOSAS</b>  <b>Rev. 00</b>			
--	--	--	--


REV	FECHA	CAUSA DE LA MODIFICACION	Elaborado por:

	Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Nombre:	Lic. Delimar Pérez	Profa. Adelitza Strubinger	
Cargo:			
Firma:			
Fecha:			

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 2 de 23

## Tabla de Contenido

<b>1</b>	<b>OBJETO</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ALCANCE Y CAMPO DE APLICACION</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>3</b>
3.1	DOCUMENTOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN.....	3
<b>4</b>	<b>GENERALES</b> .....	<b>3</b>
4.1	PRINCIPIOS GENERALES .....	3
4.2	DEFINICIONES .....	4
4.3	ABREVIATURAS.....	6
<b>5</b>	<b>DESARROLLO</b> .....	<b>6</b>
5.1	NECESIDAD ANALÍTICA DE LA METODOLOGÍA .....	6
5.2	PUESTA A PUNTO .....	6
5.3	SELECCIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN. FIJACIÓN DE OBJETIVOS .....	7
5.4	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	7
5.4.1	<i>Preparación de patrones Certificados (EPA 5021A)</i> .....	8
5.4.2	<i>Preparación de las muestras de BTEX</i> .....	9
5.4.3	<i>Condiciones de Trabajo del Cromatografo de Gases HP 6890 con el que se realizaron las mediciones..</i> 9	
5.4.4	<i>Determinación de la función de respuesta</i> .....	10
5.4.5	<i>Determinación del Limite de Detección y límite de Cuantificación</i> .....	11
5.4.6	<i>Determinación de la Linealidad</i> .....	11
5.4.7	<i>Determinación de la Reproducibilidad</i> .....	12
5.4.8	<i>Determinación de la Recuperación</i> .....	13
5.5	ENSAYOS & TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS OBTENIDOS .....	13
5.5.1	<i>Selectividad / especificidad</i> .....	14
5.5.2	<i>Linealidad</i> .....	14
5.5.3	<i>Sensibilidad</i> .....	15
5.5.4	<i>Limite de detección (del método)</i> .....	16
5.5.5	<i>Limite de cuantificación (del método) (LC)</i> .....	16
5.5.6	<i>Precisión (Repetibilidad / Reproducibilidad)</i> .....	16
5.5.7	<i>Exactitud</i> .....	18
5.6	DECLARACIÓN DE LA VALIDACIÓN .....	18
5.7	CONTROL DEL MÉTODO. REVALIDACIÓN.....	19
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>20</b>
6.1	ANEXO 1. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE REFERENCIA DE BTEX .....	20
6.2	CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE ESTÁNDAR INTERNO.....	22
6.3	ANEXO 2. DECLARACIÓN DE VALIDACIÓN .....	23

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 3 de 23

## 1 Objeto

Describir el conjunto de actividades que debe realizar el laboratorio a fin de recabar evidencia objetiva que le permita confirmar que aplica correctamente el método de ensayo EPA 5021 para la extracción de los compuestos orgánicos volátiles usando el análisis de vapor en equilibrio, conocido por su término en inglés "Headspace" y el análisis por la normativa EPA 8015C aplicando la técnica Cromatografía Gaseosa con detector de ionización a la llama para la determinación de BTEX en muestras acuosas y demostrar que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico previsto.

## 2 Alcance y Campo de Aplicación

Este procedimiento abarca la identificación de los parámetros y objetivos de validación, el diseño experimental, la determinación de los parámetros de validación y la elaboración de la declaración de validación para la determinación cuantitativa de benceno, tolueno, etilbenceno, o-m-p xilenos (BTEX) en diferentes muestras acuosas, cuyos orígenes son mayormente efluentes de plantas de tratamiento, aguas superficiales asociadas a ríos y lagos, aguas subterráneas, redes cloacales y agua potable

## 3 Referencias


### 3.1 Documentos utilizados en la elaboración

1. Método Estandar EPA 8015C. Compuestos orgánicos no halogenados por cromatografía de gases. Rev 3. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA. 2007
2. Environmental Protection Agency, 2007.
3. FONDONORMA-ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
4. James N. Miller y Jane C. Miller. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición, Pearson Educación. S.A. Madrid. 2002
5. Aguirre L, García F, García T, Illera M, Juncadella M, Lizondo M, et al. Validación de métodos analíticos. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI); 2001.
6. Método estándar EPA 5021A. Compuestos orgánicos volátiles en varias matrices usando análisis de equilibrio headspace. Rev 1. publicado en SW-846 Ch 4.2.1 por US EPA. 2003

## 4 Generales

### 4.1 Principios Generales

Cuando un laboratorio decide implantar un Sistema de Gestión de la Calidad basado en la Norma ISO/IEC 17025 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTEX
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	Rev. N° 00
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	Fecha: 23/03/15
		Página 4 de 23

calibración" asume al mismo tiempo un conjunto de lineamientos establecidos en esta los cuales le permiten adaptar sus procesos y procedimientos a estándares internacionales que conducen a un mejoramiento sistemático de sus actividades, lo cual redundará finalmente en la plena satisfacción del cliente.

En este grupo de lineamientos, la norma ISO establece en la Cláusula 5.4.2 párrafo 2, que el laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos o las calibraciones. Esto a su vez implica que debe recabarse evidencia objetiva para demostrar lo establecido en dicha cláusula. Al mismo tiempo, tanto la norma ISO 9000 como la ISO 17025 establecen que la Validación es una confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva que se cumplen los requisitos para una aplicación específica prevista.

Este proceso de validación utilizado rigurosamente para métodos no normalizados o métodos adaptados o modificados, establece una metodología que puede ser utilizada como guía para realizar la confirmación necesaria y requerida por la ISO 17025 para los métodos normalizados.

#### 4.2 Definiciones

- a. **Validación:** Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. (ISO 9000:2005)
- b. **Verificación:** Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos. (ISO 9000:2005)
- c. **Exactitud de una medición:** Grado de concordancia entre el resultado notificado y el valor de referencia aceptado. (ISO 3534-1)
- d. **Repetibilidad:** Precisión en condiciones de repetibilidad, i.e. condiciones bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos accesorios de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos. (ISO 3534-1).
- e. **Reproducibilidad:** Precisión en condiciones de reproducibilidad, i.e. condiciones bajo las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, en un material idéntico, en diferentes laboratorios por diferentes operadores usando diferentes equipos. (ISO 3534-1).
- f. **Precisión intermedia:** Magnitud que relaciona la variación en los resultados observados cuando uno o más factores, tales como tiempo, equipamiento, operador, varían dentro de un mismo laboratorio (EURACHEM/CITAC 2000).

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	D-RT-VDM- BTE
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/1
		Página 5 de 23

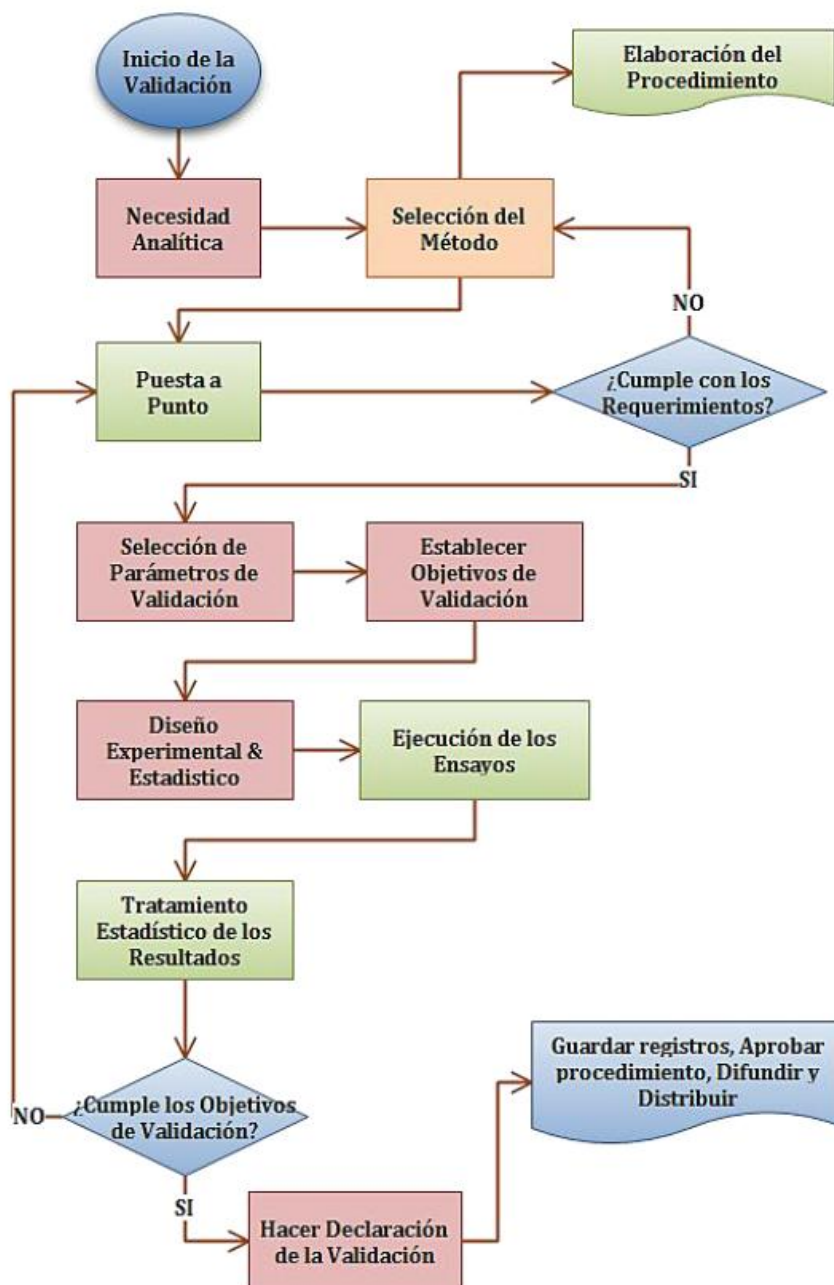



Figura 1. Esquema del proceso de validación

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 6 de 23

### 4.3 Abreviaturas

BTEX	→	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno
HS	→	vapor en equilibrio o "Headspace"
ISO	→	Organización Internacional para la Estandarización
LD	→	Límite de detección
LC	→	Límite de cuantificación
US EPA	→	Agencia de protección ambiental de los estados unidos por sus siglas en inglés "US Environmental Protection Agency"
ppm	→	partes por millón

## 5 Desarrollo

### 5.1 Necesidad Analítica de la Metodología

En esta sección se describe la necesidad analítica del laboratorio en relación a la determinación de BTEX en matrices acuosas, en los niveles de concentración que van desde 0,05ppm hasta 0,15ppm. A partir de los cuales se selecciona la técnica y metodología más adecuada y la cual es de uso de rutina en el laboratorio de desechos tóxicos, la metodología EPA 8015C "Compuestos orgánicos no halogenados pro cromatografía de gases". Esta es una metodología normalizada modificada ya que se han variado algunas especificaciones del método como lo son las características de la columna empleada. Es por esto que el método es validado con las nuevas especificaciones


Aún en el caso de que el método elegido esté publicado como norma internacional, nacional o regional, y con el objeto de atender los requisitos de la norma ISO 17025 relativos a métodos (5.4.2. selección de métodos), es conveniente (en muchos casos preciso, cuando es necesario complementar la norma con información adicional para asegurar su correcta aplicación) proceder a la elaboración de un procedimiento interno que recoja, por un lado todos los aspectos técnicos del método y por otro los aspectos formales y de calidad de la ISO 17025. ES IMPORTANTE REALIZAR UN DIAGRAMA DETALLADO DE TODO EL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS.

### 5.2 Puesta a punto

La "Puesta a punto" de un método es una actividad previa a la validación que debe realizar el laboratorio para llegar a tener un conocimiento general del mismo. Con esta actividad se consigue que el método "funcione" produciendo unas respuestas razonablemente aceptables y consistentes.

Para ello, es necesario "afinar" el proceso del método en todos sus apartados, prestando una especial consideración a los diversos parámetros instrumentales de aplicación. Puede ser necesario volver a esta etapa si los resultados de la validación no son aceptables.

En esta sección si indican los ajustes que se realizan a las distintas variables del método.

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTEX
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	Rev. N° 00
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	Fecha: 23/03/15
		Página 7 de 23

### 5.3 Selección de parámetros de Validación. Fijación de objetivos

Como se dice en la norma ISO 17025, los requisitos que deben cumplir los métodos (de sus parámetros de validación) deben ser especificados previamente a la validación. Estos requisitos establecidos "a priori" son los objetivos de validación.

En algunos casos, la fijación de estos objetivos está establecida por la propia demanda que ha originado la necesidad analítica.

En otros casos no se dispone de requisitos "de obligado cumplimiento" y nos resulta más complicado establecer objetivos de validación. En estos casos, la fuente de información debe ser, además de las diferentes referencias bibliográficas, la propia experiencia adquirida en la puesta a punto del método o nuestra experiencia con métodos similares o la experiencia del "mercado".

Hay que dejar registro de los parámetros elegidos y de sus objetivos, los parámetros mayormente empleados son:

1. Selectividad / Especificidad
2. Intervalo de trabajo
3. Linealidad
4. Límite de detección
5. Límite de cuantificación
6. Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)
7. Exactitud

Teniendo en cuenta la necesidad analítica del laboratorio y la experiencia obtenida en la puesta a punto, se establecieron los parámetros de validación fundamentales para la determinación de BTEX en muestras aguas (ver la Tabla 1)


**Tabla 1.** Parámetros y objetivos de validación para la determinación de BTEX en aguas

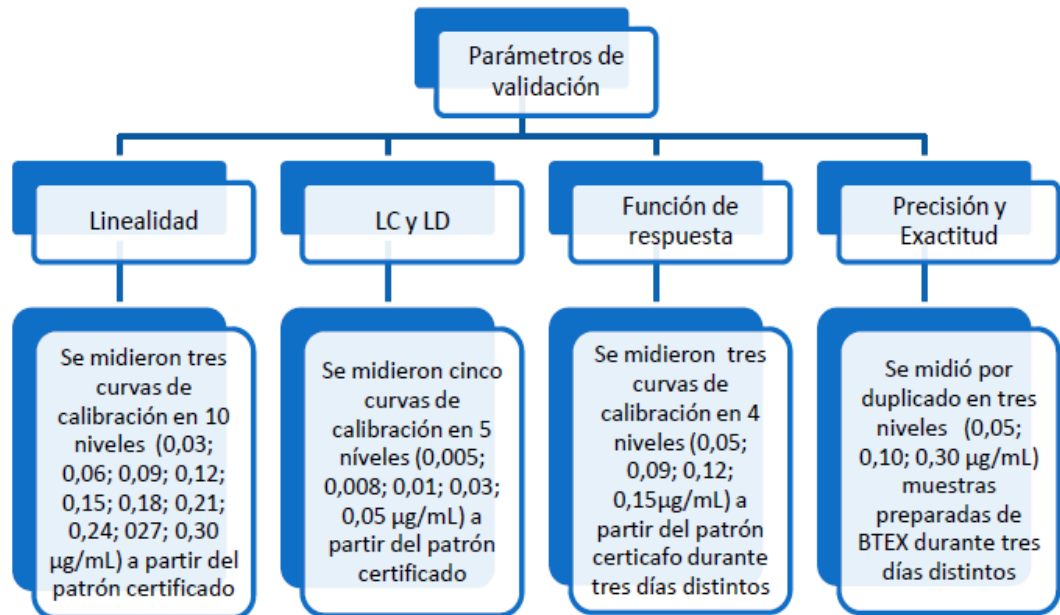
Parametros de Validación	Objetivo
Alcance	Recuperación de BTEX en aguas
Intervalo de Trabajo	0,05 – 0,15 µg/mL
Precisión	Límite de Repetibilidad ≤ 10% Límite de Reproducibilidad ≤ 20%
Linealidad	%CV < 20%
Exactitud	Recuperaciones ≥ 80%

### 5.4 Diseño experimental

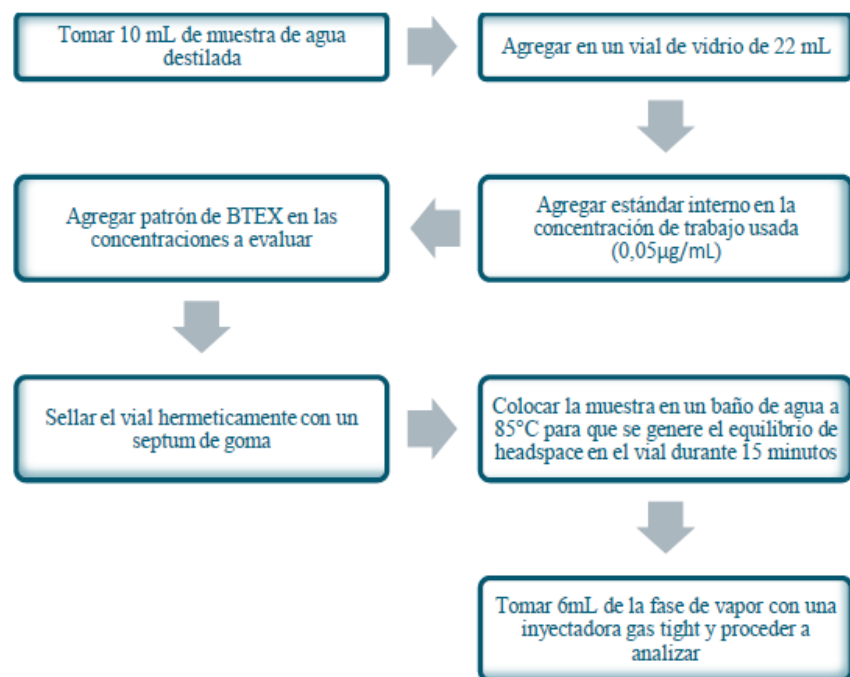
El diseño experimental que se siguió en la validación, así como el tratamiento estadístico realizado a los datos experimentales son mostrados a continuación.



	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 8 de 23



#### 5.4.1 Preparación de patrones Certificados (EPA 5021A)




	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTEX
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	Rev. N° 00
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	Fecha: 23/03/15
		Página 9 de 23

#### 5.4.2 Preparación de las muestras de BTEX

Se preparó un patrón de BTEX de 100.000 µg/mL desde los solventes puros de benceno, tolueno, etilbenceno y la mezcla de xilenos, a partir de esta mezcla se preparó una solución de trabajo de 10 µg/mL la cual fue usada para el estudio de precisión y exactitud. Las muestras fueron preparadas según la metodología descrita anteriormente.

#### 5.4.3 Condiciones de Trabajo del Cromatografo de Gases HP 6890 con el que se realizaron las mediciones

<b>inyector</b>	Modo	Split			
	Temperatura	250°C			
	Presión	15,41 psi			
	Flujo total	41,6 mL/min			
	Split radio	25 : 1			
	Split flujo	37,4 mL/min			
	Gas servido	20 mL/min a 2 min			
	Tipo de gas	Helio			
	Volumen de inyección	6 mL			
<b>Columna</b>	Modelo	Columna capilar de silice fundido Rxi-5ms marca RESTEK de 30m, 250 µm de diámetro interno, 0,25µm de espesor de película; catalogo # 13423 serial # 823634			
	Modo	Flujo constante			
	Flujo inicial	1,5 mL/min			
	Presión	15,42 psi			
	Volumen promedio	33 cm/s			
<b>Horno</b>	#	Rampa °C/min	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Tiempo Total (min)
	0	-	35	3,0	3,0
	1	6,0	80	0,0	10,50
	2	30,0	250	0,0	16,17

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTEX
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	
	Rev. N° 00	
		Fecha: 23/03/15
		Página 10 de 23

Se realizó el tratamiento estadístico a través del **Análisis de varianza** simple de los resultados obtenidos para obtención de la **precisión** por niveles. Se determinó la **exactitud** (recuperación) en cada nivel, por días y general, se estudio la **linealidad** a través del Analisis de varianza simple y se obtuvieron los **límites de detección y de cuantificación**, del **intervalo de trabajo** asociado a cada nivel.

Los datos que se obtuvieron cada día se organizaron en tablas de acuerdo con el siguiente modelo:

#### 5.4.4 Determinación de la función de respuesta

Patrón	Días (Relación de áreas compuesto/ estándar interno)		
	1	2	3
C <sub>1</sub> (0,05 µg/mL)			
C <sub>2</sub> (0,90 µg/mL)			
C <sub>3</sub> (0,12 µg/mL)			
C <sub>4</sub> (0,15 µg/mL)			
r <sup>2</sup>			
m			
L <sub>0</sub>			
Datos de realización del análisis			
Fecha			
Equipo			
Elaborado por:			
Revisado por:			

**Leyenda:**

A<sub>i</sub>: son las lecturas de areas obtenidas.

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: son los valores de concentraciones de BTEX asignados a los patrones.

r<sup>2</sup>: coeficiente de regresión.

m: pendiente.

L<sub>0</sub>: Intercepto




#### 5.4.5 Determinación del Límite de Detección y límite de Cuantificación

$X_i$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_4$	$Y_5$	$\bar{y}_j$	Desv std
0,005							
0,008							
0,010							
0,030							
0,050							
m				$r^2$			
$L_0$				r			
LC				LD			


#### 5.4.6 Determinación de la Linealidad

$X_i$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$\bar{y}_j$	Desv Std
0,03					
0,06					
0,09					
0,12					
0,15					
0,18					
0,21					
0,24					
0,27					
0,30					

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTEX
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	
	Rev. N° 00	
		Fecha: 23/03/15
		Página 12 de 23

#### 5.4.7 Determinación de la Reproducibilidad

Concentraciones de BTEX en las muestras				
		Días (relación de áreas compuesto/ estándar interno)		
Nivel	Submuestra	1	2	3
0,05 µg/mL	1			
	2			
Media diaria				
0,10 µg/mL	1			
	2			
Media diaria				
0,30 µg/mL	1			
	2			
Media diaria				
Media General				
Análisis simple de varianza				
		Entre grupos $DCM_B$		Dentro de grupos $DCM_w$
Diferencias cuadráticas medias				
Cálculo de la Reproducibilidad del nivel				
	Desviación estándar de repetibilidad $s_r$	$s_L$	Desviación estándar de reproducibilidad $s_R$	Coeficiente de variación CV
<b>Resultado</b>				
Datos básicos del ensayo				
	Días			
	1	2	3	
Fecha				
Equipo				
Elaborado por				
Revisado por				

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 13 de 23

#### 5.4.8 Determinación de la Recuperación


Día	Submuestra	$C_{esperada}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$C_{obtenida}$	% Recuperación ( $R_j$ )	% Recuperación promedio( $R$ )
1	1				
	2				
2	1				
	2				
3	1				
	2				
Datos básicos del ensayo					
	Días				
	1	2	3		
<b>Fecha</b>					
<b>Equipo</b>					
<b>Elaborado por</b>					
<b>Revisado por</b>					

#### 5.5 Ensayos & Tratamiento estadístico de datos obtenidos

El procesamiento de todas las muestras previstas cada día, de acuerdo con el diseño experimental, se realizó en condiciones de repetibilidad y siguiendo el método completo. Se obtuvieron los distintos parámetros de validación, siguiendo el diseño estadístico establecido que se muestra más adelante.

Como se ha previsto en el apartado anterior de diseño, el procesamiento de todas las muestras de cada día se realizó en condiciones de repetibilidad y siguiendo el método completo. Los patrones se prepararon cada día con el fin de recoger la variabilidad que proviene de dicha preparación. Como se partió de una solución "madre", no fue necesario preparar dicha solución cada día, siempre y cuando se controló su deriva.

Las muestras fueron procesadas siguiendo el método completo, para poder dar trazabilidad al resultado final (la función de respuesta realizada con patrones "limpios", si no han seguido el

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 14 de 23

método completo, puede dar trazabilidad a los resultados de los procesados pero no al procesamiento seguido).

Obtención de los distintos parámetros de validación:

### 5.5.1 Selectividad / especificidad

Normalmente, salvo en el caso de que estemos validando un método completamente desarrollado de nuevo por el laboratorio, este parámetro de validación se resuelve bibliográficamente, ya que los métodos seleccionados, de reconocida aplicación, cuentan con información sobre su selectividad y especificidad y las interferencias que se conocen.

Para poder asegurar la selectividad y especificidad de un método, cuando se conoce la existencia de interferencias, por experiencia previa o por información bibliográfica, habrá que diseñar un estudio experimental del efecto de las mencionadas interferencias, mediante la adición de cantidades conocidas de componente interferente.


Los efectos matriz que puedan existir se estudian en la función de respuesta.

### 5.5.2 Linealidad

Para evaluar la linealidad se determinó dentro del rango establecido 10 niveles de concentración por triplicado para un total de 30 muestras. Se realizó la comprobación estadística de los siguientes parámetros:

- Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen
- Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>)
- Varianza residual constante (homoscedasticidad)

Pendiente	$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}$
Intercepto	$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$
Coeficiente de correlación	$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}}$
Varianza residual	$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$
Varianza de la pendiente	$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}$
Varianza del intercepto	$S_a^2 = S_b^2 \times \frac{\sum x^2}{n}$

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 15 de 23

- Análisis de la variancia de la regresión lineal

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_i^2}$$

Tabla para la suma de cuadrados para el análisis de variancia en la linealidad

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F calculados
<i>Regresión</i>	$SC_{reg} = \sum n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$V_{reg} = \frac{SC_{reg}}{1}$	$F_1 = \frac{V_{reg}}{V_{res}}$
<i>Falta de ajuste</i>	$SC_{FA} = \sum n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$k - 2$	$V_{FA} = \frac{SC_{FA}}{k - 2}$	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{exp}}$
<i>Error experimental</i>	$SC_{exp} = \sum \sum (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$\sum n_i - k$	$V_{exp} = \frac{SC_{exp}}{\sum n_i - k}$	
<i>Total</i>	$SC_T = \sum \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$	$\sum n_i - 1$	$V_{t = \frac{SC_T}{\sum n_i - 1}}$	

- Prueba de linealidad

$$\%CV = \frac{S_f}{f} * 100$$

- Prueba de verificación de la pendiente o de linealidad

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

Test de proporcionalidad

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

### 5.5.3 Sensibilidad

La sensibilidad de una función de respuesta es la pendiente de la curva de calibración en cada punto (para una función de respuesta lineal la pendiente ( $m$ ) de la recta).



	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTEX
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	Rev. N° 00
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	Fecha: 23/03/15
		Página 16 de 23

Este parámetro va a ser más importante a la hora de efectuar posteriores calibraciones y realizar un seguimiento del método, que en la propia validación del mismo.

#### 5.5.4 Límite de detección (del método)

El límite de detección (**LD**) para métodos cromatográficos se calculó a partir de los métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco, esto se hizo a niveles bajos de concentración y su valor se calculó mediante la siguiente expresión:

$$C_l = \frac{Y_{bl} + (k * S_{bl})}{b}$$

Donde k = 3 para el cálculo de límite de detección y 10 para el cálculo del límite de cuantificación

#### 5.5.5 Límite de cuantificación (del método) (**LC**)

Es el valor, superior al **LD**, a partir del cual los resultados que se obtienen cumplen unos condicionantes de precisión y de exactitud predeterminados por exigencias de norma, cliente. Dependiendo de los condicionantes, el **LC** puede coincidir con el **LD**.

#### 5.5.6 Precisión (Repetibilidad / Reproducibilidad)

La precisión de reproducibilidad que mide la siguiente  $s_R$  es la **del método en el laboratorio** (es por tanto una medida de precisión intermedia según el esquema de la norma ISO 5725, que define la  $s_R$  como desviación estándar de reproducibilidad del método en el "mercado", incluyendo la variabilidad que proviene de los distintos laboratorios de un ensayo interlaboratorios adecuado).

El estudio de la precisión se realizó calculando, a través del análisis simple de varianza (ANOVA de dos factores totalmente anidados homogéneos), las desviaciones estándar de repetibilidad ( $s_r$ ) y de reproducibilidad ( $s_R$ ) para cada uno de los niveles de ensayo.

TABLA PARA EL ANÁLISIS SIMPLE DE LA VARIANZA

CADA NIVEL	Día				
Observaciones	1	2	3	4	5
1	$C_{11}$	$C_{21}$	$C_{31}$	$C_{41}$	$C_{51}$
2	$C_{12}$	$C_{22}$	$C_{32}$	$C_{42}$	$C_{52}$
3	$C_{13}$	$C_{23}$	$C_{33}$	$C_{43}$	$C_{53}$



Las medias de cada día están definidas por:  $\bar{C}_i = \frac{\sum_{j=1}^3 C_{ij}}{3}$

La media general es:  $\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^3 C_{ij}}{15} = \frac{\sum_{i=1}^5 3\bar{C}_i}{15} = \frac{\sum_{i=1}^5 \bar{C}_i}{5}$

Análisis simple de varianza

Origen de la varianza	Grados de libertad ( $\nu$ )	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/ $\nu$ )
Entre grupos	$\nu_1 = i-1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^i j(\bar{C}_i - \bar{C})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{\nu_1}$
Dentro del grupo	$\nu_2 = i \cdot j - i$	$SDC_W = \sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j (C_{ij} - \bar{C}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{\nu_2}$
Total	$\nu = i \cdot j - 1$ (= $\nu_1 + \nu_2$ )	$SDC_G = \sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j (C_{ij} - \bar{C})^2$  (= $SDC_B + SDC_W$ )	$DCM_G = \frac{SDC_G}{\nu}$

De acuerdo a ISO 5725 (UNE 82009):


La desviación estándar de repetibilidad ( $s_r$ ) es  $s_r = \sqrt{DCM_W}$

La desviación estándar de reproducibilidad ( $s_R$ ) es  $s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$

donde  $s_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{i}$ ,

siendo el denominador igual al número de observaciones que se realizan cada día (en cada nivel).

Si, por efectos aleatorios,  $s_L^2 < 0$ , debe asumirse  $s_L^2 = 0$  (normalmente debería cumplirse que  $DCM_B > DCM_W$  y en caso contrario deberían existir razones que lo justificaran).

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 18 de 23

Las  $s_r$  y  $s_R$  del método estarán comprendidas entre el valor menor y el valor mayor de todas las desviaciones típicas calculadas (todos los niveles) (o CV's si se quiere presentar en términos relativos, que es más comparable).

Si el intervalo de trabajo del método es muy amplio, es razonable esperar que las  $s$  sean significativamente diferentes para cada punto de la función de respuesta del método, lo que nos obligaría a tomar decisiones relativas a la definición de su uso por tramos. (En algunos casos podría ser conveniente tratar de establecer si existe alguna relación funcional entre las  $s$  y los respectivos niveles de ensayo).

### 5.5.7 Exactitud

La exactitud del método se estableció por la comparación de los resultados obtenidos en el diseño experimental, de las muestras de BTEX preparadas con los valores teóricos de los mismos, observando el grado de concordia entre el valor obtenido y el valor esperado.

La recuperación en cada punto se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{\text{obtenido}}}{C_{\text{esperado}}} \times 100$$

Donde:

$C_{\text{obtenido}}$  es el resultado obtenido del análisis del MR utilizado, y

$C_{\text{esperado}}$  es el valor teórico del mismo.


La recuperación global del método se calculó a partir de la media de las individuales en cada punto (indicaremos el intervalo de recuperaciones obtenidas), cuando las recuperaciones en los diversos niveles son similares.

Si la recuperación no es similar en las distintas concentraciones del intervalo de trabajo y se observa que existe una posible relación entre la concentración y la recuperación (positiva o negativa), para la cuantificación de las muestras reales deberíamos establecer la función que relaciona nivel de concentración con recuperación o recurrir sistemáticamente al método de adiciones estándar

### 5.6 Declaración de la validación

Como se acaba de decir, si los objetivos predefinidos se han cumplido, podemos proceder a declarar el método validado. Dicha declaración, formal, en la que se recogen las características del método (parámetros de validación). Se deben guardar todos los registros que justifican el proceso seguido de acuerdo con el sistema de la calidad instaurado. A saber:

- Origen de la necesidad analítica.
- Borrador del método con todos sus documentos anexos y relacionados.

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 19 de 23

- Parámetros de validación seleccionados y objetivos preestablecidos.
- Diseño experimental y estadístico realizado.
- Registros de ensayos realizados.
- Tratamiento de los datos obtenidos.
- Declaración de método validado.

En el Anexo 2 se presenta el formulario con la Declaración/Observación de Validación.

**NOTA:** Si luego del proceso el laboratorio ha cumplido con todos los objetivos propuestos, se declara validado su desempeño en el método estudiado, en caso contrario, se plantean las observaciones pertinentes para la continuación de las actividades de validación hasta cumplir con los objetivos establecidos.

### **5.7 Control del método. Revalidación**

Todo procedimiento declarado como validado se considerará validado mientras no se produzcan cambios que impidan asegurar que se mantiene bajo control. Dado que la validación es una actividad continua que se alimenta, fundamentalmente, de los datos que se obtienen de las actividades que se realizan en el terreno de la calibración y del control de calidad, puede llegar el caso de que, como resultado de esta actividad continuada, sea necesario cambiar los límites de aplicación del método. Si se produce esta situación, deberemos proceder a una nueva declaración de validación, apoyada en todos los registros que la soportan



Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio

INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN  
Determinación de BTEX en Muestras Acuosas

Código:  
D-RT-VDM- BTEX  
Rev. N° 00  
Fecha: 23/03/15  
Página 20 de 23

## 6 ANEXOS

### 6.1 Anexo 1. Certificado de análisis de los patrones de referencia de BTEX



660 Tower Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599  
1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729  
info@chemservice.com • www.chemservice.com

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

INVOICE #: CS256255  
PO #: 1084498

CATALOG #: MBTEX-2RPM

DESCRIPTION: California PVOC (Revised) Mixture (repkg)  
in Methanol


LOT #: 315-23B

EXPIRATION DATE: 07/05

The following compounds are contained in the mixture at the stated concentrations:

1000ug/ml	F4	Benzene
1000ug/ml	F909	tert-Butyl methyl ether
1000ug/ml	F38	Ethylbenzene
1000ug/ml	F86	Toluene
1000ug/ml	F719	o-Xylene
1000ug/ml	F829	m-Xylene
1000ug/ml	F830	p-Xylene



	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código: D-RT-VDM- BTE2
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b>	Rev. N° 00
	Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	Fecha: 23/03/15
		Página 21 de 23



660 Tower Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599  
 1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729  
 info@chemservice.com • www.chemservice.com

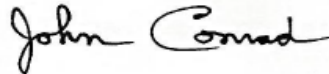
Chem Service, Inc. guarantees the concentration of the above to be as stated  $\pm$  5%.

This product was compared to an independently prepared sample. Determined by either GC/FID, GC/TCD, GC/ECD, GC/MS or HPLC. This data is available upon request.

Weights of analytes less than or equal to 99% are corrected for impurities.

Our standards are suitable for use with all EPA methods.

Certified By:



John Conrad  
CSM/TC






Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio


INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN  
Determinación de BTEX en Muestras Acuosas

Código:  
D-RT-VDM- BTEX  
Rev. N° 00  
Fecha: 23/03/15  
Página 22 de 23

### 6.2 Certificado de análisis de estándar interno

125 Market Street  
New Haven, CT 06513 USA  
Tel (203) 786-5280 Fax (203) 786-5287  
www.accustandard.com

 **AccuStandard, Inc.**



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

CATALOG NO: M-8020-IS-10X      EXPIRATION: Jul 10, 2014  
DESCRIPTION: 4-Bromofluorobenzene & a,a,a-Trifluorotoluene  
LOT: B4070138  
SOLVENT: MeOH

This product is guaranteed accurate to ± 0.5% of the Certified Analyte concentration through the Expiration Date on the Label.

Component	CAS #	Purity % (GC/FID)	Prepared Concentration <sup>1</sup> (µg/mL)	Certified Analyte Concentration <sup>2</sup> (µg/mL)
p-Bromofluorobenzene	460-00-4	100	2001 ± 0.04	2001
a,a,a-Trifluorotoluene	99-08-8	100	2002 ± 0.08	2002

3 Components

1. All weights are traceable through NIST, Test No. 802234486.  
2. Certified Analyte Concentration = Purity x Prepared Concentration. The Uncertainty calculated for this product is the Combined Uncertainty (U). It represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The Expanded Uncertainty is U which is (k)u, where k is the coverage factor at the 95% confidence level (k=2). Values reported above are an Expanded Combined Uncertainty.  
3. A product with a suffix (-IA, -20, etc.) on its label has had its expiration date extended and is identical to the same lot without the suffix.

Certified by: R. Cooper

This product was manufactured to meet the quality system requirements of ISO 9001:2000 and ISO 17025

OR-ORGANON-001 Rev. 06/05

A license of use information contained herein without written permission from AccuStandard is strictly prohibited.

	<b>Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio</b>	Código:
	<b>INSTRUCTIVO DE VALIDACIÓN</b> Determinación de BTEX en Muestras Acuosas	D-RT-VDM- BTEX
		Rev. N° 00
		Fecha: 23/03/15
		Página 23 de 23

### 6.3 Anexo 2. Declaración de Validación

	Registro de Datos y Resultados Declaración/ Observación del Desempeño del Laboratorio
--	--

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	Determinación de BTEX en aguas por Cromatografía de Gases acoplada a detector de llama (GC/FID)
-------------------------	---

PARAMETROS DE VALIDACIÓN	OBJETIVO	RESULTADO
ALCANCE	Validación de BTEX en muestras acuosas por cromatografía de gases acoplada a detector de llama	No Conforme
INTERVALO DE TRABAJO	0,05 A 0,15 µg/mL	Se evaluaron muestras entre 0,05 y 0,30 µg/mL
LINEALIDAD	$m = \text{diferente de cero}$ $L_0 = \sim 0$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ $G_{exp} < G_{TABLA}$ $F_{1exp} > F_{1TABLA}$ $F_{2exp} < F_{2TABLA}$ $CV_f < 20\%$ $t_{s\ exp} > t_{s\ TABLA}$ $t_{s\ exp} < t_{s\ TABLA}$	Se cumplieron todos los criterios de aceptación para cada parámetro evaluado en cada compuesto medido
LÍMITE DE DETECCIÓN	$LD \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$	0,004 a 0,012 µg/mL
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	$LC \leq 0,05 \mu\text{g/mL}$	0,014 a 0,040 µg/mL
PRECISIÓN	CV de Repetibilidad $\leq 10\%$	No conforme para benceno, tolueno y xilenos a 0,05 µg/mL
	CV de Reproducibilidad $\leq 20\%$	Conforme para todos los niveles (0,05; 0,10 y 0,30 µg/mL)
EXACTITUD	Recuperaciones $\geq 80\%$	No conforme
<b>DECLARACIÓN / OBSERVACIÓN</b>		
Es requerida una nueva evaluación para superar las no conformidades obtenidas, cuando se cumplan las acciones de re-entrenamiento del personal en los procesos asociados a la aplicación de las metodologías, la adquisición de sistemas automatizados de "headspace" y la disponibilidad de patrones certificados a diferentes niveles de concentración de BTEX.		
NOTA: LOS REGISTROS CON LOS DATOS Y RESULTADOS QUE SOPORTAN LA VALIDACIÓN DE ESTE PROCEDIMIENTO ANALÍTICO ESTAN DISPONIBLES EN EL SISTEMA DE DOCUMENTACIÓN DEL LABORATORIO		
APROBADO POR		
NOMBRE	FIRMA	FECHA
		CARGO