



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA
DETERMINACIÓN DE BENCENO EN SUELOS
MEDIANTE HS-GC-FID Y SU APLICACIÓN EN
BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CO-CONTAMINADOS
CON Hg (II)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de:

Química Ambiental

Nataly Andrea Rojas Molina

Director del Seminario de Título:

Dr. Luis Rojas Araya

Director Patrocinante:

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo

Marzo 2019

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

NATALY ANDREA ROJAS MOLINA

“VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE BENCENO EN SUELOS MEDIANTE HS-GC-FID Y SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS CO-CONTAMINADOS CON Hg (II)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental.

Director Seminario de Título: Dr. Luis Rojas Araya _____

Patrocinante Seminario de Título: M. Cs. Sylvia Copaja Castillo _____

Comisión revisora y evaluadora:

Presidente Comisión: Dr. Antonio Galdámez _____

Evaluador: Dra. Marcia Cazanga _____

Santiago de Chile, marzo 2019.

RESEÑA



Nataly Rojas Molina nació el 16 de mayo de 1995 en Antofagasta, como primera y única hija de María Luisa y Oscar. Su periodo académico a nivel básico lo desarrolló en el colegio Corazón de María. En la enseñanza media se trasladó al colegio Hrvatska Skola San Esteban, donde descubrió su interés por la ciencia en especial por los fenómenos ambientales y la química gracias a su profesora jefa Dorliza.

En el año 2013 con 17 años, junto con el constante apoyo y confianza de sus padres decidió mudarse a Santiago en compañía de sus abuelos paternos para ingresar a la carrera de Química Ambiental en la Universidad de Chile, y descubrir lo que despertaría su motivación por resolver problemáticas ambientales.

DEDICATORIA

Un verdadero logro solo se disfruta cuando se comparte. Dirigido a todas las grandes personas que estuvieron acompañándome durante este proceso, tómense todas las atribuciones y siéntanse parte de esto.

Principalmente a mis maravillosos padres Oscar y María Luisa, gracias por otorgarme todas las herramientas, y formarme con los valores que me han convertido en la persona que hoy soy. Agradezco el incesante apoyo y confianza de ustedes, ya que gracias a ello logré estudiar lo que realmente quise.

A mis abuelos maternos María y Raúl por el incondicional apoyo y cariño a distancia, que junto a mi tía Juana y primo Francisco me recibieron celebrando cada vez que llegaba a Antofagasta para las vacaciones.

A mis abuelos paternos Julio y Rebeca quienes me permitieron compartir diariamente durante estos 5 años en Santiago, donde estuvieron para regalarme y apapacharme cada día en casa.

A mis pequeños hermanos Francisca, Constanza y Benjamín.

A mi amiga de toda la vida Melissa, y mi gran amiga y compañera de carrera Camila a quienes admiro tremendamente, y siempre estuvieron desde la distancia aportando con palabras de apoyo, motivación y aliento cuando más lo necesité.

A mis inigualables compañeros del Departamento de Química de la UCN, quienes me hicieron partícipe del grupo desde el comienzo. Especialmente a mi amiga Andrea que gracias al mutuo apoyo logramos avanzar y finalizar esta etapa juntas.

A nuestro “team” biorremediación Exequiel y David que sin sus conocimientos y buena onda el trabajo no habría sido tan agradable y exitoso.

A quienes celebran conmigo este logro desde arriba, tía Inés y tía Paty.

A mi compañero de sonrisas y buenos momentos Nicolás.

Dirigido especialmente a mi mejor amiga, consejera y madre María Luisa Molina Mur, por ayudarme a concluir esta etapa poniéndole el hombro a todos los obstáculos y enseñarme que lo más importante en esta corta vida es ser feliz. Este logro está dedicado especialmente a ti mamita linda.

AGRADECIMIENTOS

Con aprecio, agradezco a mi director de tesis, Dr. Luis Rojas por la ayuda que sostuvo día a día, donde a pesar de las múltiples ocupaciones que tuviese siempre abrió las puertas de su oficina, incluso para una reunión de último minuto. Además, por la tremenda oportunidad de permitirme exponer en un congreso y, enseñarme que la autoconfianza y seguridad son la clave para un óptimo desarrollo académico.

Con gran cariño, agradezco a mi Profesora Patrocinante Sylvia Copaja quien a pesar de encontrarse lejos siempre estuvo presente al momento de alguna inquietud, disponible para gestionar una reunión y recibirme cuando me encontraba en Santiago.

A los grandes profesores del laboratorio de orgánica del Departamento de Química de la UCN, Marcia Pérez y Víctor Kesternich quienes me permitieron ocupar diariamente un espacio en su laboratorio y me acogieron desde el primer día como una alumna más de la Universidad, incluyéndome en todas las entretenidas y lindas celebraciones.

A mis compañeros del Departamento de Química de la UCN, Víctor Q., Benjamín H., Andrea B., Rocío I., Exequiel M., Elizabeth C., Diego P., Katherinne P., y Javier S., por sacarme una sonrisa/carcajada cada día, instruirme en la espera semanal de un viernes, y enseñarme que los amigos también pueden llegar a ser tu segunda familia, en este caso familión.

Finalmente, agradecer a la Universidad Católica del Norte por entregar el apoyo económico a esta investigación por medio del proyecto semilla RES. VRI NRO 187/2017.

INDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.2. Antecedentes específicos.....	2
1.2.1. Aspectos generales del suelo	2
1.2.2. Contaminación de suelos.....	3
1.2.3. Contaminación de suelos por metales pesados y su toxicidad	4
1.2.3.1. Contaminación por mercurio.....	6
1.2.4. Contaminación de suelos por compuestos orgánicos y su toxicidad.....	7
1.2.4.1. Contaminación por benceno	9
1.2.5. Fenómenos de interacción química de los contaminantes en el suelo.....	10
1.2.5.1. Dinámica de los compuestos orgánicos en el suelo.....	11
1.2.5.2. Mecanismos que rigen el comportamiento de los metales pesados en suelo ..	11
1.2.6. Co-contaminación de suelos.....	12
1.2.7. Suelos co-contaminados en Chile.....	14
1.2.8. Remediación de suelos	16
1.2.9. <i>Cupriavidus metallidurans</i> MSR33.....	19
1.2.10. Metodología para determinar benceno en suelo.....	19
1.2.11. Validación de una metodología	21
1.2.11.1. Linealidad.....	22
1.2.11.2. Sensibilidad	22
1.2.11.3. Selectividad	22
1.2.11.4. Exactitud.....	22
1.2.11.5. Precisión	23
1.2.11.5.1. Repetibilidad.....	24
1.2.11.5.2. Reproducibilidad	24
1.2.11.5.3. Test de Fisher	24
1.2.11.6. Veracidad.....	24
1.2.11.6.1 Sesgo.....	24

1.2.11.6.2. Recuperación	25
1.2.11.7. Límite de detección (LD)	25
1.2.11.8. Límite de cuantificación (LC)	25
1.3. Desafíos del presente trabajo.....	25
1.3.1. Imposibilidad de utilizar solventes orgánicos	25
1.3.2. Imposibilidad de perturbar los microcosmos	26
1.4. Objetivo General	27
1.5. Objetivos específicos.....	27
II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Muestra de suelo agrícola.....	28
2.2. Pretratamiento del suelo	29
2.3. Reactivos	30
2.4. Materiales	31
2.4.1. Lavado de material	31
2.5. Equipos.....	32
2.5.1. Balanza de humedad.....	32
2.5.2. Sistema de headspace acoplado a un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (HS-GC-FID)	33
2.6. Determinación de las curvas de calibrado	36
2.6.1. Preparación de las soluciones estándar.....	36
2.6.2. Fortificación de los niveles de concentración de benceno en suelo	38
2.7. Determinación de los parámetros de validación.....	40
2.7.1. Linealidad.....	40
2.7.2. Sensibilidad	42
2.7.3. Precisión en las curvas de calibrado	42
2.7.3.1. Repetibilidad de las curvas de calibrado	42
2.7.3.2. Reproducibilidad de las curvas de calibrado	43
2.7.3.3. Índices de repetibilidad (r) y de reproducibilidad (R)	44
2.7.4. Precisión del método	45

2.7.4.1. Repetibilidad del método.....	45
2.7.4.2. Reproducibilidad del método	45
2.7.5. Exactitud.....	46
2.7.5.1. Recuperación	46
2.7.5.2. Sesgo y error relativo.....	47
2.7.6. Fortificación de los niveles de rango bajo y alto	48
2.7.7. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	49
2.8. Biorremediación	51
2.8.1. Condiciones experimentales del ensayo	51
2.8.2. Fortificación del suelo con mercurio	52
2.8.3. Preparación de la solución de benceno y posterior dopaje de los microcosmos	52
2.8.4. Inoculación de los microcosmos utilizando las bacterias	53
2.8.5. Tiempos de muestreo.....	53
2.8.6. Determinación de la concentración de benceno	54
III. RESULTADOS	55
3.1. Validación del método analítico.....	55
3.1.1. Selectividad	55
3.1.2. Linealidad.....	56
3.1.3. Sensibilidad	59
3.1.4. Precisión en las curvas de calibrado	60
3.1.4.1. Repetibilidad en las curvas de calibrado	60
3.1.4.2. Reproducibilidad en las curvas de calibrado promedio.....	61
3.1.4.3. Índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R).....	62
3.1.5. Precisión del método	65
3.1.5.1. Repetibilidad del método.....	66
3.1.5.2. Reproducibilidad del método	67
3.1.6. Exactitud.....	68
3.1.6.1. Análisis de recuperación.....	68

3.1.6.2. Sesgo y error relativo.....	71
3.1.7. Límites.....	72
3.1.7.1. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	73
3.2. Biorremediación.....	76
3.2.1. Cinética de biorremediación.....	77
IV. DISCUSIÓN.....	79
4.1. Desafíos demandados por el proceso de biorremediación.....	79
4.1.1. Determinación de benceno en una matriz compleja como el suelo.....	79
4.1.2. No se utilizó estándar interno (IS).....	81
4.2. Temperatura en la preparación de muestras.....	81
4.3. Tiempo de análisis.....	82
4.4. Validación del método.....	83
4.4.1. Linealidad.....	83
4.4.2. Intervalo de trabajo.....	84
4.4.3. Precisión.....	84
4.4.3.1. Precisión en curvas de calibrado.....	84
4.4.3.2. Precisión del método.....	85
4.4.4. Exactitud.....	86
4.4.5. Límites de detección y de cuantificación.....	87
4.5. Aplicación del método validado en un proceso de biorremediación bacteriana	89
V. PROYECCIONES.....	90
VI. CONCLUSIONES.....	91
VII. REFERENCIAS.....	93
ANEXOS.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores involucrados en la interacción de los contaminantes en el suelo.....	10
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del suelo.....	29
Tabla 3. Reactivos utilizados en la metodología.....	30
Tabla 4. Materiales utilizados para realizar una curva de calibración.	31
Tabla 5. Concentraciones y volúmenes empleados en la construcción de las curvas de calibrado.....	40
Tabla 6. Criterio de aceptación para el porcentaje de recuperación dependiendo de la concentración del analito.....	47
Tabla 7. Condiciones del ensayo de biorremediación.....	51
Tabla 8. Coeficientes de correlación (r) obtenidos en las curvas de rango bajo y alto. ...	56
Tabla 9. Coeficientes de determinación (r^2) obtenidos en las curvas de rango bajo y alto.	57
Tabla 10. Desviación estándar relativa (%RSD) obtenidas en las curvas de rango bajo y alto.....	58
Tabla 11. Componentes de las rectas de calibrado de las curvas de rango bajo y alto. Pendiente (b), intercepto (a), desviación estándar de la pendiente (Sb) y desviación estándar del intercepto (Sa).	59
Tabla 12. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de repetibilidad obtenidos en las tres curvas de calibrado de rango bajo.	60
Tabla 13. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de repetibilidad obtenidos en las tres curvas de calibrado de rango alto.	61
Tabla 14. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de reproducibilidad obtenidos en la curva promedio de calibrado de rango bajo.	62
Tabla 15. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de reproducibilidad obtenidos en la curva promedio de calibrado de rango alto.	62
Tabla 16. Índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R).	63

Tabla 17. Diferencia de cada nivel de concentración entre las curvas de calibrado de rango bajo.....	64
Tabla 18. Diferencia de cada nivel de concentración entre las curvas de calibrado de rango alto.....	64
Tabla 19. Test de Fisher aplicado a las curvas de rango bajo y alto.	65
Tabla 20. Coeficientes de variación obtenidos en los cuatro niveles de fortificado en condiciones de repetibilidad.....	66
Tabla 21. Coeficientes de variación obtenidos en los cuatro niveles de fortificado en condiciones de reproducibilidad.	67
Tabla 22. Análisis de recuperación de los cuatro niveles de fortificado.	69
Tabla 23. Valores de sesgo y porcentaje de error relativo para los niveles de fortificado.	71
Tabla 24. Valores de t calculado en los niveles de fortificado.....	72
Tabla 25. Parámetros para la determinación de los límites de detección y cuantificación de la curva promedio de rango bajo y alto.	73
Tabla 26. Tabla resumen con los valores de los parámetros asociados a las figuras de mérito evaluadas en la validación.	75
Tabla 27. Ventajas prácticas del método analítico desarrollado frente a otros reportados.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales contaminantes en suelos. Hidrocarburos clorados (HCC) Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos (BTEX) (Modificado de Van Liedekerke y col., 2014).	13
Figura 2. Suelos con potencial presencia de contaminantes a nivel nacional (SPPC) (MMA, 2016).	14
Figura 3. Categorización de las tecnologías utilizadas en la remediación “ <i>in situ</i> ” de suelos contaminados (Modificado de Song y col., 2017).	17
Figura 4. Esquema sobre los parámetros que relaciona la exactitud del método.....	23
Figura 5. Mapa físico del suelo agrícola. El sitio de muestreo se encuentra indicado con el pin rojo.	28
Figura 6. Materiales utilizados en el pretratamiento del suelo. A. Tamiz B. Mortero de cerámica y pistilo. C. Recipiente de vidrio con suelo.....	30
Figura 7. A. Balanza para determinar la humedad del suelo. B. Platillos de aluminio...32	
Figura 8. Sistema HS-GC-FID. A. Headspace. B. Cromatógrafo de gases.	34
Figura 9. Rampa de temperatura utilizada en el análisis de benceno.	35
Figura 10. Esquema del sistema HS-GC-FID con sus respectivos parámetros de medición utilizado para la determinación de benceno.	35
Figura 11. Esquema del procedimiento experimental implementado en la preparación de las soluciones estándar. A. Curva de rango bajo. B. Curva de rango alto.	37
Figura 12. Caja aislante con hielo conteniendo el material de plástico.	38
Figura 13. Esquema de la fortificación en los niveles de concentración de las curvas. A. Niveles de concentración en las curvas de rango bajo. B. Niveles de concentración en las curvas de rango alto.	39
Figura 14. Esquema del procedimiento experimental para los fortificados. A. Niveles de fortificado de rango bajo. B. Niveles de fortificado de rango alto.....	49
Figura 15. Muestras del ensayo de biorremediación dispuestas en el baño termorregulado.	53

Figura 16. Esquema resumen del procedimiento experimental aplicado en el ensayo de biorremediación.....	54
Figura 17. Comparación cromatográfica entre la matriz de suelo (A. Cromatograma superior, amplificado 100 veces) con respecto a la matriz de suelo fortificado con 200 mg×Kg ⁻¹ de benceno (B. Cromatograma inferior sin amplificar).....	55
Figura 18. Gráfico del porcentaje de recuperación de los cuatro niveles de fortificado.	70
Figura 19. Cinética de pérdida de benceno en microcosmos de suelo a través de bioaumentación con cultivos de <i>C. metallidurans</i> MSR33.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos
PCBs	Bifenilos policlorados
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HCC	Hidrocarburos Clorados
HTP	Hidrocarburos Totales de Petróleo
COVs	Compuestos Orgánicos Volátiles
SPPC	Suelos con Potencial Presencia de Contaminantes
HS	Headspace
GC	Cromatógrafo de gases
FID	Detector de ionización de llama
MS	Espectrometría de masas
SPME	Solid Phase Microextraction
LD	Límite de Detección
LOD	Limit of Detection
LC	Límite de Cuantificación
LOQ	Limit of Quantitation

RESUMEN

Los suelos se han constituido como el principal sumidero de metales pesados y otros contaminantes producto de causas naturales y actividades antropogénicas. Ejemplo de estas actividades son las mineras que liberan metales pesados, tales como Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} , y las plantas petroquímicas que producen hidrocarburos aromáticos como Benceno, Tolueno, Etilbenceno, y Xilenos (BTEX) a partir de la fracción volátil del petróleo.

El objetivo de este seminario de título consiste en validar un método analítico para la cuantificación de benceno en microcosmos conformados por muestras de suelo co-contaminado contenidas en viales, a los cuales se le adiciona una bacteria especializada. De esta forma, se desarrolla una metodología para determinar benceno remanente en suelo, carente de solventes orgánicos, simple y costo-efectiva, mediante un sistema de extracción de espacio de cabeza acoplado a un cromatógrafo de gases junto a un detector de ionización de llama (HS-GC-FID), que permita monitorear la cinética de remoción de benceno en un suelo co-contaminado con Hg (II), durante un proceso de biorremediación bacteriana utilizando la cepa modificada genéticamente *Cupriavidus metallidurans* MSR33 que es altamente resistente a mercurio. De esta manera, en el presente trabajo se utilizó un suelo contaminado con benceno y mercurio como una aproximación a una situación real de co-contaminación, donde se aplicó una técnica de remediación a través de la utilización de bacterias especializadas capaces de remover benceno en presencia de mercurio.

La medición de benceno con la metodología validada permitió monitorear la cinética de biorremediación utilizando la bacteria *C. metallidurans* MSR33 entregando información rápida y veraz al aplicar directamente en viales con microcosmos de suelo contaminados con Benceno $200 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ y Hg (II) $2 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$. La determinación de benceno permitió demostrar que este proceso de biorremediación conforma una novedosa tecnología costo-efectiva y amigable con el medioambiente, aplicable a suelos impactados con BTEX en presencia de metales tóxicos.

ABSTRACT

Soils have been established as the main sink for heavy metals and other pollutants due to natural causes and anthropogenic activities. Examples of these are mining activities which release heavy metals, such as Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} and Zn^{+2} , and petrochemical plants which produce aromatic hydrocarbons such as Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) from volatile fractions of petroleum.

The aim of this seminar consists of validate an analytical method for the quantification of benzene in microcosms consisting on vials containing co-contaminated soil samples, which are inoculated with a specially adapted bacterial culture. The methodology was developed in order to measure benzene concentrations remaining in soil in an organic solvent-free, simple and cost-effective manner. This was carried by means of a headspace extraction system coupled to a gas chromatograph with flame ionization detector (HS-GC-FID), that allowed to monitor the kinetics of benzene removal in a soil co-contaminated with Hg (II), during the process of bacterial bioremediation with the genetically modified strain *Cupriavidus metallidurans* MSR33 that is highly resistant to mercury. Thus, soil samples polluted with benzene and mercury were used on this research as a practical approach to a real co-contamination scenario. A remediation technique was applied by means of bacteria specially adapted to remove benzene from soil in presence of mercury.

The measurement of benzene with the validated methodology allowed to monitor the kinetics of bioremediation using the *C. metallidurans* MSR33 bacterial strain delivering

fast and accurate information when applied directly in vials with soil microcosms contaminated with Benzene $200 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ and Hg (II) $2 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$. The determination of benzene allowed to demonstrate that this process of bioremediation forms a novel, cost-effective and environmental-friendly technology, potentially useful for treatment of soils impacted with BTEX in the presence of toxic metals.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales

El impacto que sufre el medioambiente producto de la extracción de los recursos naturales ha perturbado negativamente a todos los componentes ambientales. El suelo forma parte de los componentes afectados dado que representa un ecosistema susceptible de ser perturbado por diversas actividades antropogénicas, tales como: minería, petroquímica, industrias químicas y agricultura. Los sitios emplazados en las cercanías de estas actividades están expuestos a presentar contaminación de diversa naturaleza dependiendo de la fuente de emisión, manifestándose a través de la presencia de metales pesados, compuestos volátiles, compuestos orgánicos persistentes, o bien, una mezcla de ellos. Esta problemática ha conducido al desarrollo de diversas estrategias para la remediación de suelos basadas en los tradicionales principios fisicoquímicos. Sin embargo, la mayoría de estas estrategias son de alto costo, poco eficientes y en algunos casos terminan transfiriendo el contaminante desde un componente ambiental a otro (suelo-atmósfera). Es por ello que surge la demanda para el desarrollo de nuevas estrategias de remediación que sean efectivas y de bajo costo, de fácil manejo, específicas y amigables con el medio ambiente, considerando que los tipos de contaminación son cada vez más complejos y de distinta naturaleza química.

1.2. Antecedentes específicos

1.2.1. Aspectos generales del suelo

El suelo es la parte superficial de la corteza terrestre, y es considerado como un recurso no renovable producto de su lenta formación (Towhid, 2003). El suelo representa un componente primordial en el medio ambiente que se traduce en un recurso natural de vital importancia para el desarrollo de la vida. Este componente, mediante sus múltiples funciones otorga beneficios ecosistémicos que permiten desarrollar bienes para la vida humana y el medio ambiente. En términos holísticos, algunos de estos beneficios son:

- La producción de alimentos y biomasa donde el suelo se constituye como soporte y principal suministro de nutrientes para las plantas a fin de generar alimentos.
- El suelo participa en la regulación de los recursos hídricos mediante la captura, almacenamiento y filtración del agua, permitiendo la purificación de forma natural y regulando las inundaciones propensas a ocurrir en periodos de abundante lluvia (Conde, 2015).
- Participa en los ciclos biogeoquímicos de elementos claves para la vida como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, etc., generando condiciones estables para la mantención de las concentraciones de estos elementos, en sus diversas especies, con el propósito de asegurar el desarrollo de la vida en la Tierra (Burbano-Orjuela, 2016).
- El suelo posee la capacidad para almacenar el carbono, impidiendo que gran parte del CO₂ emane hacia la atmósfera, disminuyendo la concentración de este gas de efecto invernadero que propicia el calentamiento global (Burbano-Orjuela, 2016).

De esta manera, el suelo se convierte en un elemento clave en la producción de alimentos, la extracción de materias primas y el soporte físico, por lo que se cataloga como un componente indispensable del cual depende la sociedad a nivel global.

1.2.2. Contaminación de suelos

Los suelos se han constituido como el principal sumidero de todos los desechos tóxicos generados a partir de actividades naturales y antropogénicas (Sherameti & Varma, 2015). La contaminación de suelos producto de actividades naturales proviene de fenómenos atmosféricos, emisiones volcánicas y meteorización de la roca madre (Galán & Romero, 2008). Algunos de estos contaminantes se encuentran comúnmente en cantidades trazas, ya que el propio suelo regula estas concentraciones naturales mediante su poder amortiguador otorgado por el contenido de materia orgánica, arcilla, entre otros componentes afines con metales.

En Chile la contaminación de los suelos se genera principalmente por las actividades productivas de la minería, refinería, agricultura y pesca, generando contaminación por metales pesados, metaloides, pesticidas; bifenilos policlorados (PCBs); hidrocarburos clorados; hidrocarburos aromáticos monocíclicos como benceno, tolueno, etilbenceno e isómeros del xileno, denominados como BTEX; e hidrocarburos aromáticos policíclicos denominados como HAPs (MMA, 2012; IAP, 2016).

El conjunto de estos contaminantes afecta al suelo ocasionando problemas de degradación y la pérdida de calidad. Según el Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN) la degradación del suelo implica el cambio en una o más de sus propiedades a condiciones inferiores que las originales, por medio de procesos físicos, químicos y biológicos

(CIREN, 2010). Se denomina degradación de tipo física cuando el suelo pierde su capacidad de retención de agua o permeabilidad. Así mismo, la degradación biológica involucra la disminución de materia orgánica y microorganismos, lo que afecta directamente su fertilidad. Por último, la degradación química se relaciona con problemas de salinización, alcalinización, acidificación y toxicidad (MMA, 2016). Las principales vías de contaminación de suelos incluyen la depositación atmosférica, irrigación de aguas residuales, apilamiento inadecuado de los desechos sólidos industriales, actividades mineras, derrames de productos petroquímicos, y el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes (Ezquerro y col., 2014). El tiempo de permanencia de los contaminantes es más extenso en el suelo que en la hidrósfera y atmósfera, dado que estas sustancias se acumulan rápidamente, mientras que su eliminación se efectúa de forma gradual (Sherameti & Varma, 2015).

1.2.3. Contaminación de suelos por metales pesados y su toxicidad

Los metales pesados involucran aquellos elementos metálicos que presentan características metálicas y tienen una densidad específica mayor a $5 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$ (Weast, 1984). Así mismo, desde el punto de vista de la salud humana, son considerados elementos potencialmente tóxicos (Volke y col., 2004; Alloway, 2013). Los metales pesados están presentes de manera natural en la corteza terrestre, y muchos de ellos tales como cobre, níquel, zinc, cobalto, entre otros, son necesarios para el funcionamiento metabólico en plantas, animales y seres humanos. Sin embargo, llegan a ser perjudiciales para los organismos a concentraciones elevadas. Las altas concentraciones de metales pesados en

los suelos agrícolas son preocupantes debido a su persistencia, toxicidad y su alto potencial de bioacumulación (Ali y col., 2013).

La contaminación por metales pesados se refiere a la depositación excesiva de metales pesados tóxicos en el suelo causada principalmente por actividades humanas (Pagnanelli y col., 2004). En los últimos años los niveles de contaminación y la variabilidad de metales pesados en suelo se ha incrementado producto del desarrollo de múltiples actividades antropogénicas (Su y col., 2014). La presencia de altas concentraciones de metales pesados tóxicos en suelos genera un importante riesgo tanto para los seres humanos como para el ecosistema a través de la ingesta o contacto con el suelo contaminado, la cadena alimenticia y la reducción en la calidad de los alimentos producto de la fitotoxicidad que estos generan (Wuana & Okieimen, 2011). Así mismo, una vez que el suelo sufre contaminación por metales pesados resulta dificultoso efectuar su remediación. Estudios señalan que la recuperación de los suelos contaminados con metales pesados podría tardar alrededor de unos doscientos años en ser remediados (Wood, 1974).

Los suelos se han catalogado como el principal sumidero de metales pesados liberados al medio ambiente producto de las actividades antropogénicas, y a diferencia de los contaminantes orgánicos que se pueden oxidar a carbono (IV) por acción microbiana, los metales pesados no sufren degradación microbiana o química, por lo que la concentración total en los suelos persiste durante mucho tiempo después de su introducción (Wuana & Okieimen, 2011).

1.2.3.1. Contaminación por mercurio

Los metales pesados se han utilizado en muchas actividades a lo largo del tiempo, y a pesar de que los efectos adversos sobre el medio ambiente son conocidos, el uso de metales pesados aún persiste, incluso, su uso continúa aumentando en ciertas actividades como la electrónica. En América Latina se continúan utilizando cantidades importantes de mercurio en las mineras artesanales para efectuar la extracción de oro por el proceso de amalgamiento (Järup, 2003). El oro se separa de la amalgama de mercurio mediante la aplicación de calor, permitiendo su destilación, generando vapores tóxicos más pesados que el aire, terminando finalmente en suelos por depositación.

La presencia de mercurio en aguas domésticas, industriales y suelos agrícolas ha ido en aumento y se cataloga como una de las principales causas de contaminación para los organismos vivos. Tal es el caso acontecido en la Bahía de Minamata, Japón, donde una empresa farmacéutica descargaba al mar grandes cantidades de mercurio causando un envenenamiento en la población, donde cientos de personas desarrollaron enfermedades neurológicas, daño cerebral e incluso la muerte (McAlpine & Araki, 1958).

El mercurio es uno de los metales pesados más tóxicos que se puede encontrar en el medio ambiente (Oehmen y col., 2014), dado que provoca severos daños a nivel renal y neurológico en organismos vivos (Mergler y col., 2007). Sin embargo, el nivel de toxicidad depende de la forma química en que se encuentre. El mercurio se puede encontrar en su forma elemental (Hg^0), inorgánica en forma de sales, óxidos y sulfuros (HgO , HgCl_2 , HgS), o como compuestos organomercuriales como etil mercurio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) y metil mercurio (CH_3Hg^+). Este último corresponde a la forma química

más peligrosa, dado que se puede acumular fácilmente en el organismo humano, producto de la ingesta de especies acuáticas que estuvieron expuestas a la contaminación por mercurio. Por otro lado, el mercurio en forma de sales Hg (II) interacciona con la materia orgánica del suelo y en condiciones oxidantes se acumula en el horizonte húmico. Cuando llueve o el suelo se inunda, ocurren importantes cambios físicos, químicos y biológicos. Las condiciones redox varían según la demanda de oxígeno como resultado de la degradación microbiana de la materia orgánica. Como la materia orgánica lábil es degradada, parte del mercurio asociado es liberado, y una fracción es metilada por la acción bacteriana.

En la actualidad no se ha encontrado un rol biológico esencial para este metal. En humanos, la exposición aguda o crónica a mercurio puede producir cuadros graves, tales como la disminución de habilidades visuales y motoras, ataxia e insuficiencia renal (Hu y col., 2011).

1.2.4. Contaminación de suelos por compuestos orgánicos y su toxicidad

Al principio del siglo XX, se descubrieron las diversas aplicaciones del petróleo donde el diésel se posicionó como una de las fuentes de energía convencionales más importantes del mundo (Dean, 1985). Actualmente, los productos derivados del petróleo siguen representando una importante fuente de energía para la vida diaria y la actividad industrial. Sin embargo, su uso indiscriminado ha conducido inevitablemente a diversos problemas ambientales (Dados y col., 2014).

Durante el proceso de extracción de hidrocarburos se genera una importante liberación de contaminantes al ambiente (Varona-Torres y col., 2018). El suelo se encuentra susceptible

de ser contaminado por compuestos orgánicos volátiles (COVs), como benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno (BTEX). Los BTEX corresponden al grupo de hidrocarburos monocíclicos que se encuentran de manera natural en el petróleo crudo, y también son generados en las emisiones gaseosas de los volcanes y los incendios forestales. Sin embargo, la principal fuente de contaminación de suelos y acuíferos por BTEX la generan las actividades antropogénicas, tales como, la fuga de gasolina en tanques de almacenamiento subterráneos, instalaciones de distribución y diversas operaciones industriales (Prenafeta-Boldú y col., 2004). Los sitios cercanos a las industrias donde se desarrollan actividades antropogénicas como las descritas quedan expuestos a la contaminación por BTEX. De hecho, tanto el benceno como el tolueno se han considerado contaminantes ambientales en lugares donde se desarrollan dichas actividades (Cao y col., 2003).

La liberación de hidrocarburos al medio ambiente causa un daño significativo al ecosistema muchas veces irreversible, dado que contribuye a su acumulación en tejidos animales y vegetales, pudiendo causar mutaciones genéticas graves (Guarin y col., 2017). Particularmente, los compuestos BTEX son de gran preocupación debido a su alta toxicidad y carcinogenicidad. Estos compuestos se encuentran a menudo en forma de mezclas en sitios contaminados con combustibles, solventes o productos químicos, y dado su carácter tóxico, pueden causar graves perturbaciones en el equilibrio ecológico que generalmente tarda años en recuperarse (Mehlman, 1992; Dados y col., 2014).

1.2.4.1. Contaminación por benceno

El benceno corresponde a un hidrocarburo aromático de fórmula molecular C_6H_6 cuyo nombre químico, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 1,3,5 ciclohexatrieno. Este compuesto se cataloga como un compuesto orgánico volátil (COV) producto de que su punto de ebullición de $80^\circ C$ y su presión de vapor de 10 kPa a $20^\circ C$ (Anexo 1), permite encontrar parte de este compuesto en fase gas a temperatura ambiente.

El benceno está presente en la mayoría de los productos de refinería, por ende, se encuentra de manera intrínseca en el petróleo crudo (Morgan y col., 2009) y se posiciona como el hidrocarburo aromático monocíclico más tóxico y peligroso dentro del grupo de los BTEX, ya que se manifiesta generando un efecto genotóxico, promoviendo además la aparición de cáncer en humanos, expresándose mayoritariamente como leucemia (Dean, 1985; Peckham y col., 2012; Van der Perk, 2014). En consecuencia, el benceno es considerado actualmente como la cuarta sustancia prioritaria en las normas de calidad ambiental de la Unión Europea (Directive E.C., 2008). Debido a la alta toxicidad el análisis para determinar benceno en muestras ambientales se ha vuelto imprescindible (Zhao & Zhai, 2010).

1.2.5. Fenómenos de interacción química de los contaminantes en el suelo

La respuesta del suelo frente a los contaminantes se puede predecir a partir de las posibles interacciones entre los contaminantes y los diversos componentes del medio edáfico que se encuentran determinados tanto por las propiedades del suelo como por las características del contaminante. Así mismo, el destino final de un agente contaminante se encuentra sujeto por una serie de procesos que involucran distintos mecanismos y reacciones, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores involucrados en la interacción de los contaminantes en el suelo.

Propiedades del suelo	Características de los contaminantes	Mecanismos de interacción
Potencial Redox	Volatilidad	Reacciones de adsorción-desorción
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	Capacidad de formar iones	Reacciones ácido-base
Estructura	Reactividad	Reacciones de óxido-reducción
pH	Tiempo de permanencia	Reacciones de complejación
Contenido de arcilla, materia orgánica y óxido metálicos	Solubilidad	Procesos de cambio iónico

El conjunto de todos estos factores hace que el seguimiento de un contaminante en el suelo sea un proceso complejo, considerando las posibles interacciones que se pueden generar entre el contaminante, los componentes del suelo y las posibles reacciones sinérgicas con otros compuestos presentes en el mismo (Polo y col., 2002). Por ende, el grado de contaminación de un suelo no puede ser estimado exclusivamente por comparación entre los valores totales con respecto a los de referencia (Semple y col., 2001). Sino que además

se debe considerar el contexto de la contaminación en particular mediante el estudio de los factores previamente mencionados. El suelo tiene la capacidad de autodepuración ante la presencia de los contaminantes. Sin embargo, dicha capacidad de resiliencia no es infinita, puesto que la magnitud de la contaminación puede sobrepasar el poder amortiguador del suelo convirtiéndose en una fuente importante de contaminación.

1.2.5.1. Dinámica de los compuestos orgánicos en el suelo

El comportamiento de los compuestos orgánicos, como el benceno, en el suelo está regido por diversos factores que determinan su dinámica y destino final. Uno de los procesos más importantes es la adsorción, la cual se define como la acumulación de una especie química denominado adsorbato que interactúa con las partículas de una superficie sólida llamado adsorbente (Polo y col., 2002).

El proceso de adsorción está determinado por el tipo y cantidad de los componentes orgánicos presentes en el suelo, tales como: materia orgánica, ácidos húmicos y fúlvicos, contenido de carbono total. El tipo de interacciones que efectúa el benceno (adsorbato) al interactuar con el suelo (adsorbente), pueden ser débiles como las fuerzas de Van der Waals, enlace por transferencia de carga, interacciones hidrofóbicas y enlace de hidrógeno. En consecuencia, la acumulación del contaminante orgánico será mayor cuanto más intensas sean las fuerzas de enlaces con las partículas del suelo, es decir, en cuanto mayor sea la carga orgánica de este (Gevao y col., 2000).

1.2.5.2. Mecanismos que rigen el comportamiento de los metales pesados en suelo

La movilidad y solubilidad de los metales pesados determina la factibilidad de que se trasladen a cursos hídricos, generando un potencial de biodisponibilidad para los

organismos vivos. La dinámica que dirige el comportamiento de estos contaminantes en el suelo depende tanto de la especiación y reactividad de estos, como la de los propios componentes del suelo (Polo y col., 2002). Los componentes del suelo que participan en la dinámica de los metales pesados determinan el fenómeno de adsorción que hay entre ellos dependiendo de los parámetros, tales como pH, mineralogía de arcillas, contenido de materia orgánica con capacidad quelante, presencia de carbonatos, condiciones redox, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y presencia de óxidos de Fe y Mn.

El comportamiento de estos factores, conjunto con las características del metal pesado determinan el impacto ambiental de la contaminación, ya que predicen su carácter acumulativo y su toxicidad. En el caso de los suelos con fines agrícolas, la presencia de metales pesados puede disminuir la producción, ya que inhibe el crecimiento de los cultivos, debido a la toxicidad o bien acumularse en tejidos vegetales y dar paso a la introducción en la cadena trófica, afectando al crecimiento y reproducción de los organismos vivos. En algunos casos retardan la actividad microbiológica, alterando los ciclos biogeoquímicos de diferentes elementos y la reincorporación de nutrientes al suelo (Galán & Romero, 2008).

1.2.6. Co-contaminación de suelos

Existen diversas sustancias químicas que pueden contaminar los suelos, desde iones inorgánicos simples hasta moléculas orgánicas complejas, lo que permite definir dos grupos principales de contaminantes: inorgánico y orgánico (Cachada y col., 2018).

Numerosos estudios mencionan que más de un tercio de los sitios contaminados en el mundo contienen compuestos orgánicos junto a compuestos inorgánicos (Kovalick,

1991). Así mismo, estudios han documentado que el 40% de los sitios contaminados en EE.UU. dentro de la lista de prioridades de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) se encuentran co-contaminados, tanto con metales pesados como por componentes orgánicos (Sandrin y col., 2000). Ambos tipos de contaminantes se encuentran distribuidos en el suelo y sedimentos (Figura 1) representando una amenaza para la seguridad alimentaria, la salud humana y el medio ambiente ecológico (Song y col., 2017).

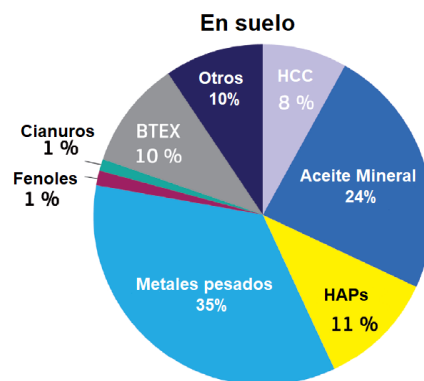


Figura 1. Principales contaminantes en suelos. Hidrocarburos clorados (HCC) Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos (BTEX) (Modificado de Van Liedekerke y col., 2014).

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) manifiesta que los desechos producidos por las actividades de extracción de minerales contienen sustancias químicas y metales pesados que generan riesgos graves para la salud humana y los ecosistemas al ser liberados al medio ambiente (OCDE, 2016).

El desarrollo productivo, industrial y energético a lo largo del país, constituyen presiones para el suelo y también pueden ser potenciales fuentes de contaminación. En Chile se han realizado avances para generar información acerca de algunas zonas del país donde

actividades productivas de esta índole estarían impactando este componente, así como la salud y la calidad de vida de las personas (MMA, 2016).

1.2.7. Suelos co-contaminados en Chile

Chile es un país minero a nivel mundial, y cuenta con las reservas más grandes de cobre en el mundo. Los recursos minerales se concentran principalmente en el norte del país, abarcando las Regiones de Atacama, Tarapacá y Antofagasta. Donde el desarrollo económico depende de manera directa de la explotación de los recursos minerales metálicos como el cobre y hierro (MMA, 2012).

Con el propósito de dimensionar la situación actual el Ministerio del Medio Ambiente (MMA) implementó una Guía Metodológica para la Gestión de Suelos con Potencial Presencia de Contaminantes (SPPC) categorizado por SPPC activo, abandonado priorizado y abandonado no priorizado, como se muestra en la Figura 2 (MMA, 2016).

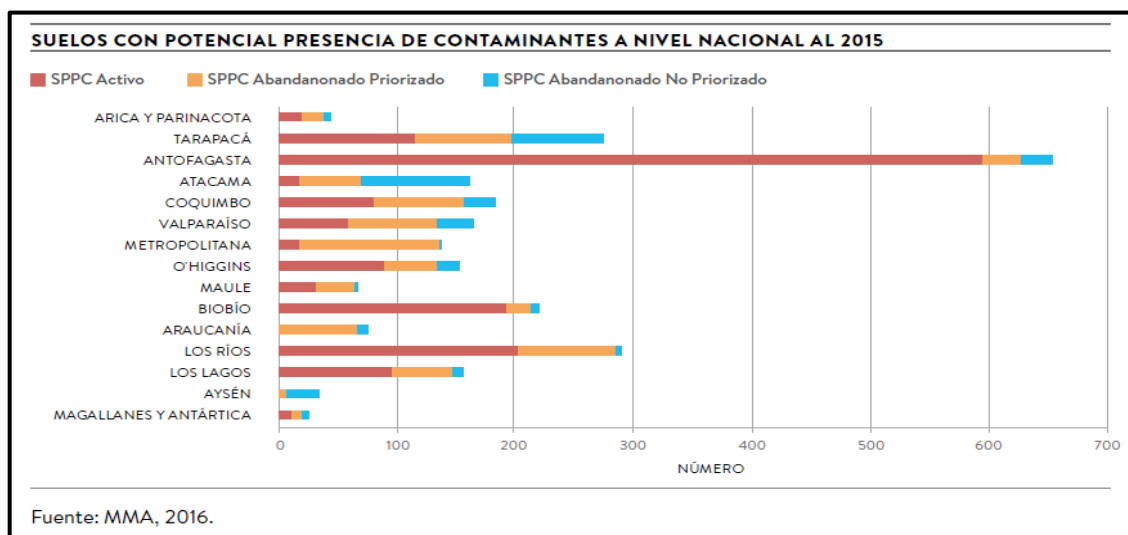


Figura 2. Suelos con potencial presencia de contaminantes a nivel nacional (SPPC) (MMA, 2016).

Antofagasta se posiciona como la Región con el mayor número de SPPC activos a nivel nacional. El Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA) realizó un análisis químico en las muestras ambientales de los SPPC situados de la Región de Antofagasta, donde se detectaron niveles de contaminantes metálicos e hidrocarburos, particularmente en la provincia de Taltal (CENMA, 2014). Por lo que la presencia de suelos co-contaminados en esta Región es un hecho, puesto que en ella se emplaza un número importante de empresas mineras e industriales que se dedican a la extracción de minerales metálicos no féreos generando contaminantes tóxicos de distinta naturaleza, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y monocíclicos (BTEX), además de algunos metales pesados como cadmio, plomo, mercurio y cobre (MMA, 2012).

Una situación similar se desarrolla en la comuna de Quintero y Puchuncaví, Provincia de Valparaíso, donde se desarrollan procesos industriales de diversa índole que generan grandes cantidades de material particulado con metales pesados emitidos a través de las plumas de las chimeneas ubicadas en las industrias (MMA, 2016). Ello implicaría la existencia de cantidades anormalmente elevadas de metales pesados en los recursos ambientales, básicamente suelos y vegetales (González & Bergqvist, 1986). Así mismo, los múltiples derrames de petróleo acontecidos en la Bahía de Quintero producto de una mala manipulación han conducido a la contaminación por hidrocarburos en suelos y sedimentos. Por tanto, se evidencia que en Chile existen suelos con potencial presencia de co-contaminación, proveniente de una contaminación mixta que generan las diversas actividades antropogénicas producto de la emisión de grandes cantidades de material particulado, aguas residuales y emisiones gaseosas con contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, contribuyendo con consecuencias catastróficas para los suelos del país,

así como la pérdida de las capacidades productivas y servicios ecosistémicos de este componente ambiental.

1.2.8. Remediación de suelos

Los peligros potenciales que resultan de la contaminación han llevado al ser humano a desarrollar diversas estrategias y métodos para la reducción y control de la contaminación en los suelos (Song y col., 2017).

Las estrategias convencionalmente utilizadas se clasifican en dos: remediación “*in situ*” y “*ex situ*”. La remediación “*in situ*” corresponde al tratamiento que se lleva a cabo en su lugar original, es decir, los contaminantes se eliminan sin trasladar el suelo. Por otro lado, la remediación “*ex situ*” se ejecuta mediante excavación y posterior tratamiento del suelo en otro lugar del sitio contaminado (Song y col., 2017). Al momento de considerar la magnitud del área contaminada y la rentabilidad, la remediación “*in situ*” se posiciona como una mejor estrategia de eliminación de contaminantes puesto que es aplicable a una gran cantidad de suelo y sedimentos contaminados, generando una menor perturbación al ecosistema, donde además la ejecución es relativamente simple y de menor costo en comparación al tratamiento “*ex situ*” (Carberry & Wik, 2001; Guiwei y col., 2008; Velimirovic y col., 2014).

La remediación de los sitios contaminados por medio de la estrategia de remediación “*in situ*” se desarrolla bajo principios físicos, químicos, biológicos o una combinación de ellos (Figura 3).

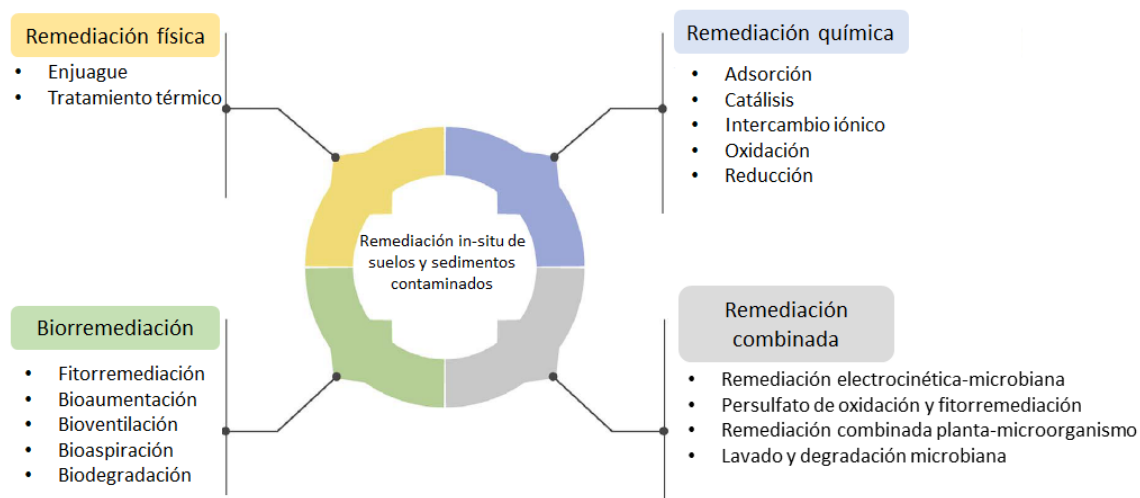


Figura 3. Categorización de las tecnologías utilizadas en la remediación “*in situ*” de suelos contaminados (Modificado de Song y col., 2017).

La remediación química es un tipo de estrategia que utiliza principios químicos para eliminación de los contaminantes, donde se incluyen principalmente mecanismos en base a catálisis, adsorción, intercambio iónico, reducción, oxidación, etc. Por otro lado, la remediación física corresponde al proceso de detención del daño al medio ambiente por medio de tecnologías físicas como tapado, enjuague, tratamiento térmico, etc. (Song y col., 2017).

Los métodos convencionalmente utilizados para la remediación *in-situ* de suelos contaminados por hidrocarburos se basan en principios fisicoquímicos que comprenden técnicas como el enjuague del suelo, extracción del vapor del suelo y los tratamientos térmicos. Sin embargo, las técnicas fisicoquímicas son generalmente de alto costo, no suelen ser específicas ni selectivas y muchas veces sólo trasladan los contaminantes de una fase a otra, convirtiéndolas en técnicas poco amigables con el medio ambiente. (Guarino y col., 2017).

La biorremediación es el proceso por el cual los contaminantes son transformados a compuestos más simples y menos tóxicos a través del potencial metabólico de los microorganismos permitiendo limpiar sitios y aguas contaminadas (Dua y col., 2002; Iturbe & López, 2015). Las principales técnicas utilizadas en la estrategia de biorremediación son la bioventilación, bioestimulación, fitorremediación mediante plantas, arbusto y/o árboles y la bioaumentación donde se utilizan microorganismos autóctonos o exógenos (Song y col., 2017). Los microorganismos utilizan los compuestos orgánicos tóxicos como única fuente de carbono y de producción de energía en forma de ATP, conduciendo a la liberación de moléculas de H₂O y CO₂ que corresponden a la mínima expresión del producto de degradación.

La biorremediación emerge como una de las tecnologías más prometedoras y de bajo costo para la eliminación del petróleo y otros hidrocarburos del medio ambiente (Lozada y col., 2012; Silva-Castro y col., 2015). De hecho, se ha convertido en una estrategia extensamente aplicada, catalogándose como la segunda tecnología de remediación más utilizada en los Estados Unidos (USEPA, 2007).

La biorremediación se ha implementado en múltiples sitios como una técnica para la remediación de contaminantes orgánicos y derivados del petróleo. De esta forma, se aplicó el proceso de biorremediación aeróbica a suelos contaminados con hidrocarburos situados al sureste de México, obteniendo una pérdida del 77,7% de los hidrocarburos al final del tratamiento (Iturbe & López, 2015). Del mismo modo, se efectuó un proceso de biorremediación aeróbica en suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo (HTP) proveniente de una refinería fuera de servicio al norte de Italia, alcanzando una reducción alrededor del 86% de HTP (Guarino y col., 2017). No obstante, se ha

comprobado que la aplicación de procesos de biorremediación en suelos co-contaminados resulta dificultoso, dado que se presenta un problema de toxicidad del microorganismo ante la presencia de metales tóxicos, lo que podría inhibir la actividad de las bacterias degradadoras (Colombo y col., 2011).

1.2.9. *Cupriavidus metallidurans* MSR33

La cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* MSR33 es una bacteria modelo resistente a múltiples metales pesados tóxicos como Zn, Ni, Cd, Co, Cu, Pb, Hg, incluso a metaloides como As (Monchy y col., 2007). Esta especie bacteriana corresponde a un microorganismo no patógeno que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente. Esta cepa fue modificada y optimizada genéticamente a través de la incorporación del plásmido pTP6 (Smalla y col., 2000) para aumentar su resistencia a mercurio orgánico e inorgánico donde ha demostrado ser eficaz en la remoción de Hg (II) en aguas contaminadas (Rojas y col., 2011). Investigaciones recientes (Millacura y col., 2017) han demostrado que esta cepa bacteriana tiene la capacidad de degradar compuestos aromáticos tóxicos, entre ellos los BTEX, por lo cual la bacteria *C. metallidurans* MSR33 promete ser un buen candidato para la biorremediación de sitios co-contaminados con BTEX y mercurio como aquellos que se sitúan cerca de las actividades mineras, metalúrgica y de refinería.

1.2.10. Metodología para determinar benceno en suelo

La aplicación de un método analítico apropiado y efectivo para la determinación de BTEX en muestras ambientales es esencial en los estudios de monitoreo en remediación de suelos (Balseiro-Romero y col., 2016). Por lo tanto, diversos trabajos de investigación se han

centrado en la validación de métodos analíticos para la determinación de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) en matrices sólidas, donde la técnica más utilizada para analizar estos compuestos corresponde al análisis por un sistema de extracción en fase sólida, conocido por sus siglas en inglés como Solid Phase Micro Extraction (SPME) acoplado a un cromatógrafo de gases (GC), ya sea con un detector de ionización de llama (FID) o de masas (MS) (Zhao & Zhai, 2010; Balseiro-Romero y col., 2016). Sin embargo, la aplicación de esta técnica demanda el uso de un equipo y análisis de alto costo. El espacio de cabeza estático conocido por sus siglas en inglés como Headspace (HS) es una técnica completamente automatizada para la extracción de COVs que ha sido ampliamente utilizada en investigaciones (Margesin y col., 2003; Rosas y col., 2010) y a diferencia de la SPME-GC-(FID/MS) tiene un menor costo. El HS tiene la ventaja de capturar mediante temperatura compuestos volátiles que están presentes en una matriz sólida o acuosa, por lo tanto, no es necesario realizar una preparación previa de la muestra donde se utilizan grandes cantidades de solventes orgánicos para poder efectuar una extracción previa del analito.

La principal limitación del análisis por HS es el efecto matriz que se manifiesta al analizar muestras ambientales, donde muestras con diferentes propiedades ejercerían distintos grados de adsorción, dependiendo principalmente de la textura y la cantidad de materia orgánica del suelo que pudieran retener al compuesto orgánico, interfiriendo por tanto en la recuperación analítica. Adicionalmente, la presencia de otros compuestos orgánicos como solventes interfieren con la capacidad de retención y de volatilización del analito, ya que generan competencias de presión de vapor dentro del HS y por tanto muchas veces

las concentraciones determinadas se encuentran subestimadas. En consecuencia, se debe evaluar las alternativas que se incluirán en la presente metodología para poder corregir estos efectos negativos que podrían afectar la recuperación del análisis. Por lo tanto, se requiere desarrollar y validar una nueva metodología para la determinación de benceno en suelo bajo las condiciones prescritas.

1.2.11. Validación de una metodología

La validación de un método analítico tiene como objetivo proporcionar evidencia científica de que el método es confiable y consistente para una utilización específica prevista (ISO 8402). El proceso de validación es un paso fundamental para asegurar la veracidad de los resultados entregados por el método y ayuda a la toma de decisiones que se ejecutan a partir de ellos. Para efectuar el proceso de validación es importante determinar con anterioridad los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación. En este caso en particular, se trata de validar un nuevo método no normalizado de carácter cuantitativo para determinar benceno en suelo y del tipo prospectivo donde los datos para validar se obtendrán experimentalmente mediante un análisis en el laboratorio. Dado que, si bien existen muchos métodos normalizados ya descritos, ninguno de ellos es aplicable para el uso previsto, es decir, para la determinación de benceno en el proceso de biorremediación bacteriano que no utilice solventes orgánicos, ni estándar interno.

El proceso de validación implica evaluar cada parámetro analítico conforme a los criterios de aceptabilidad previamente establecidos, en este caso se evaluará la linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD) y límite de cuantificación

(LC). Por tanto, si los resultados obtenidos en las pruebas, utilizando el método a validar, cumplen con los criterios de aceptabilidad se considera que el método es aceptable y aplicable (Sandoval, 2010).

1.2.11.1. Linealidad

La linealidad es la capacidad que tiene un procedimiento analítico dentro de un determinado rango para generar resultados instrumentales que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (ICH, 1995).

1.2.11.2. Sensibilidad

La sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida, es decir, el gradiente de la curva de respuesta (Eurachem, 2005).

1.2.11.3. Selectividad

La selectividad se refiere al grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar (Eurachem, 2005).

1.2.11.4. Exactitud

La exactitud expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero y el valor experimental obtenido. La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico (AEFI, 2001) y debe aplicarse a un conjunto de resultados de un ensayo que supone una combinación entre un componente común expresado mediante un error sistemático o sesgo y otro por componentes aleatorios. Por

lo tanto, la exactitud se estudia normalmente como dos componentes: “veracidad y precisión” (Eurachem, 2005), tal como se ilustra en la figura 4. La exactitud da cuenta del error total del método, por tanto, se incluye tanto el error sistemático como el aleatorio.

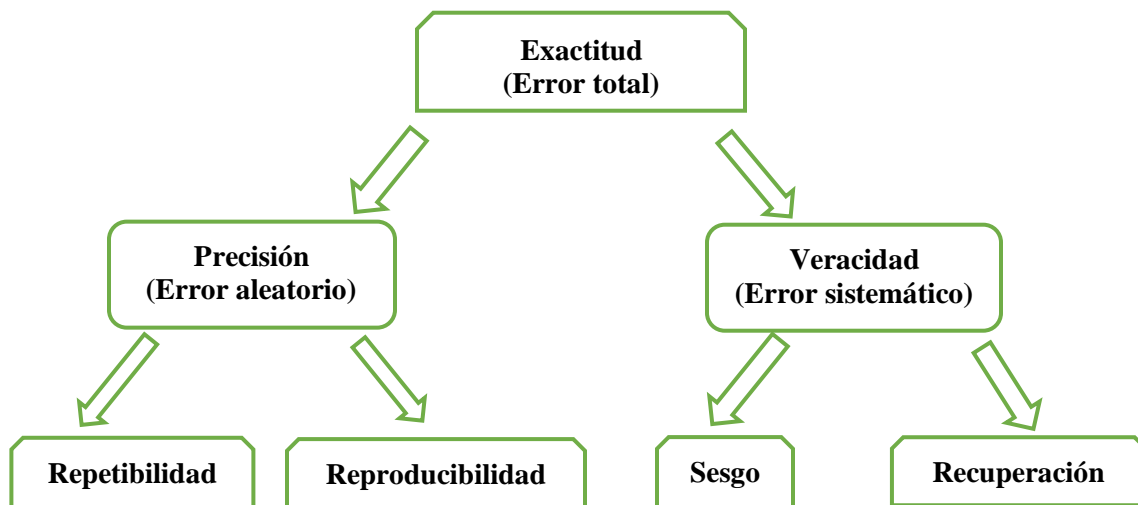


Figura 4. Esquema sobre los parámetros que relaciona la exactitud del método.

1.2.11.5. Precisión

La precisión se relaciona con el grado de concordancia entre resultados de mediciones obtenidas en el mismo o similar objeto bajo condiciones establecidas (VIM, 2006) y sólo depende de la distribución de los errores aleatorios. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la dispersión de los resultados con respecto a la media, típicamente la desviación estándar o porcentaje de coeficiente de variación, calculado a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones sucesivas bajo condiciones específicas (Eurachem, 2005). La precisión se establece en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

1.2.11.5.1. Repetibilidad

La repetibilidad corresponde a la variabilidad de los resultados del método en análisis independientes, cuando una medición se lleva a cabo en un corto plazo por un solo analista utilizando el mismo equipo (Eurachem, 2005).

1.2.11.5.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se refiere a la variabilidad de un conjunto de resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad, incluyendo diversos lugares, operadores, sistema de medición en replicas al mismo o similares objetos (VIM, 2006).

1.2.11.5.3. Test de Fisher

El test de Fisher corresponde a una prueba de variabilidad donde se demuestra estadísticamente si las varianzas de dos muestras difieren o no, reflejando el error aleatorio del conjunto de datos.

1.2.11.6. Veracidad

La veracidad de un método expresa la proximidad de la medida de un número infinito de resultados conforme a un valor convencionalmente aceptado, por lo que se incluyen solo los errores sistemáticos (Eurachem, 2005). La evaluación práctica de la veracidad se expresa cuantitativamente en términos de sesgo o recuperación (Sandoval, 2010).

1.2.11.6.1 Sesgo

El sesgo es la diferencia entre el valor experimental de un número grande de resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad y un valor de referencia (CENMA, 2014).

1.2.11.6.2. Recuperación

Corresponde a la cantidad de analito agregado a una muestra que es fortificada. Este parámetro permite determinar el rendimiento del método analítico desde la fase de extracción de la muestra hasta el análisis instrumental.

1.2.11.7. Límite de detección (LD)

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto (ICH, 1995).

1.2.11.8. Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación se define como la mínima concentración de analito que puede ser determinada cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión y exactitud (ISO 11843-1).

1.3. Desafíos del presente trabajo

Este trabajo tiene como desafío desarrollar y validar una metodología para la determinación de benceno en un proceso particular de biorremediación. Esta metodología permitirá cuantificar el abatimiento de benceno en un suelo contaminado además con Hg (II), para un proceso de biorremediación bacteriana utilizando la cepa *C. metallidurans* MSR33. Este proceso impone importantes y particulares exigencias tales como:

1.3.1. Imposibilidad de utilizar solventes orgánicos

La metodología a desarrollar se encuentra imposibilitada de utilizar solventes orgánicos, como por ejemplo metanol, que es ampliamente utilizado en los métodos normalizados

para la determinación de benceno (USEPA, 1996). Esto se debe a que la presencia de compuestos orgánicos en cantidades importantes afecta la viabilidad bacteriana perjudicando, por ende, la eficiencia del proceso de biorremediación.

1.3.2. Imposibilidad de perturbar los microcosmos

Los microcosmos de suelos co-contaminados utilizados en la metodología están imposibilitados de ser perturbados, dado que la metodología a desarrollar dentro del proceso de biorremediación debe representar un sistema cerrado donde no se puede abrir, ni perforar la tapa y septa del vial de HS donde serán construidas las muestras, ya que es posible que ocurran pérdidas del vapor de benceno, generando un artefacto, por tanto, no se puede adicionar previamente un estándar interno para efectuar la determinación de benceno.

1.4. Objetivo General

Validar un método analítico utilizando un sistema HS-GC-FID para la determinación de benceno que permita monitorear la cinética de remoción de benceno durante un proceso de biorremediación bacteriana en un suelo co-contaminado con mercurio.

1.5. Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones experimentales del sistema HS-GC-FID para la determinación de benceno.
- Determinar los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), mediante la aplicación de estadística básica.
- Aplicar la metodología validada a un proceso de biorremediación bacteriana para cuantificar el benceno en un suelo co-contaminado con mercurio y benceno.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestra de suelo agrícola

Se utilizó un suelo proveniente de una zona agrícola del Valle de Curacaví, Región Metropolitana, Santiago de Chile (Figura 5). Las muestras se tomaron en 3 puntos independientes donde en cada lugar se construyó una calicata a una profundidad de 0 – 20 cm y se recolectaron en un único contenedor de plástico.

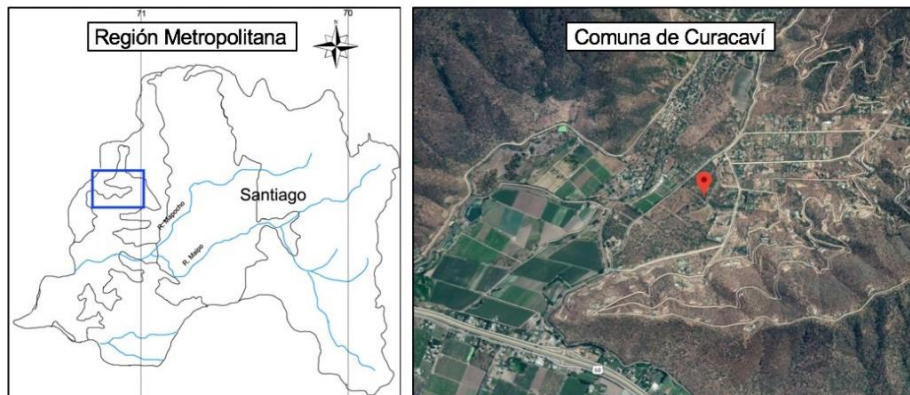


Figura 5. Mapa físico del suelo agrícola. El sitio de muestreo se encuentra indicado con el pin rojo.

La caracterización fisicoquímica del suelo se efectuó en los laboratorios de la Dirección de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile (DICTUC), donde se determinó su pH, granulometría, contenido de materia orgánica, relación C/N, NPK, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y porcentaje de agua, cuyos valores se muestran en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del suelo.

Propiedades químicas		Propiedades físicas	
pH susp	8,54	Arcilla	12%
Materia Orgánica	1,48%	Limo	24%
Totales		Arena	64%
N	0,09%	Textura	FRANCO ARENOSA
C	0,86%		
C/N	9,83%		
Disponibles			
N	113 mg×Kg ⁻¹		
P Olsen	31 mg×Kg ⁻¹		
K	177 mg×Kg ⁻¹		
Intercambiables			
Ca	5,85 meq×100g ⁻¹		
Mg	1,3 meq×100g ⁻¹		
K	0,45 meq×100g ⁻¹		
Na	0,04 meq×100g ⁻¹		
CIC	7,67 meq×100g ⁻¹		
Suma bases	7,64 meq×100g ⁻¹		
Ca/CIC	76,2%		
Mg/CIC	16,9%		
K/CIC	5,9%		
Na/CIC	0,51%		
Sat. Bases	99,5%		

2.2. Pretratamiento del suelo

El suelo bajo estudio fue tamizado (< 2 µm) utilizando un tamizador tipo Ro-Tap Humboldt Mfg. USA Standard Sieve Series (Figura 6A). Posteriormente, la muestra se homogenizó utilizando un mortero de cerámica con ayuda de un pistilo (Figura 6B). Finalmente se almacenó en un recipiente de vidrio de 2 Kg previamente ambientado y rotulado (Figura 6C).

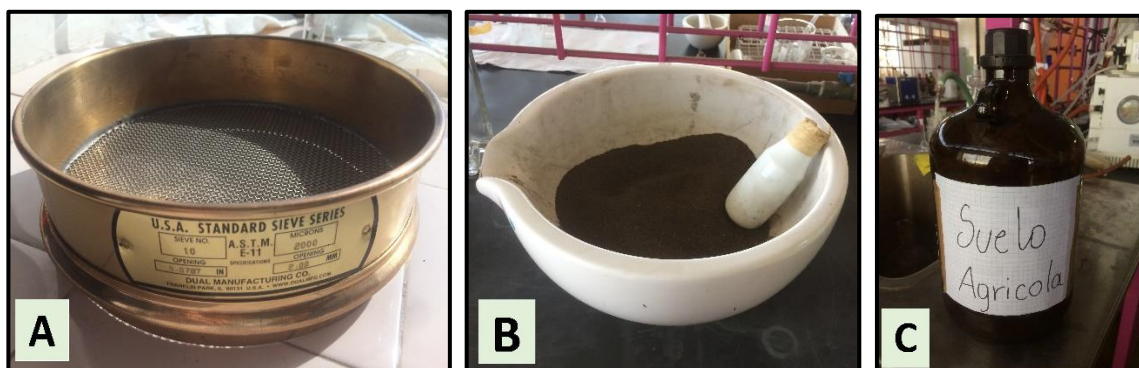


Figura 6. Materiales utilizados en el pretratamiento del suelo. **A.** Tamiz **B.** Mortero de cerámica y pistilo. **C.** Recipiente de vidrio con suelo.

2.3. Reactivos

Los reactivos utilizados en la presente metodología se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la metodología.

Reactivo	Pureza	Masa Molar ($\frac{g}{mol}$)	Procedencia
Benceno	99,7%	78,11	Merck grado HPLC
Benceno	99,5%	78,11	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Agua destilada	Grado MiliQ	-	EASYpure LF 18,2 (mΩ)
Mercurio (II) cloruro	>99,0%	271,5	Merck

2.4. Materiales

Los materiales utilizados en el desarrollo de la metodología se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Materiales utilizados para realizar una curva de calibración.

Material	Volumen (mL)	Cantidad
Matraz de aforo	100	1
Vaso precipitado	100	1
Vaso precipitado	50	1
Pipeta pasteur	-	1
Tubo falcon	15	5
Tubo eppendorf	1,7	15
Vial de vidrio	20	15
Micropipeta P1000	0,1 a 1	1
Micropipeta P200	0,02 a 0,2	1
Micropipeta P20	0,002 a 0,02	1
Micropipeta P10	0,001 a 0,01	1
Puntas desechables amarillas	0,001 a 0,2	12
Puntas desechables azules	0,1 a 1	3

2.4.1. Lavado de material

Todo material de vidrio se lavó con mezcla sulfocrómica para oxidar la materia orgánica existente que pudiese interferir con la adsorción del analito en el suelo. Posteriormente, se lavó con detergente libre de fosfatos y se enjuagó con agua potable, donde una vez limpio se le aplicó agua destilada para el secado. Todo el material de vidrio, excepto el volumétrico, se dispuso en la estufa Binder a 80°C al menos por 3 horas. Luego se almacenó en un lugar limpio.

2.5. Equipos

2.5.1. Balanza de humedad

La humedad del suelo se determinó por duplicado mediante una balanza Chanzhou Xingyun XY-101MW para medir la humedad del suelo mediante el principio termogravimétrico (Figura 7A). Para ello se dispuso una masa de suelo húmedo entre 1 – 2 gramos sobre una superficie de aluminio (Figura 7B). La balanza determina la masa inicial de la muestra, luego se calienta rápidamente por medio de la unidad halógena desecadora que emite en el IR permitiendo la evaporación del agua en la muestra.

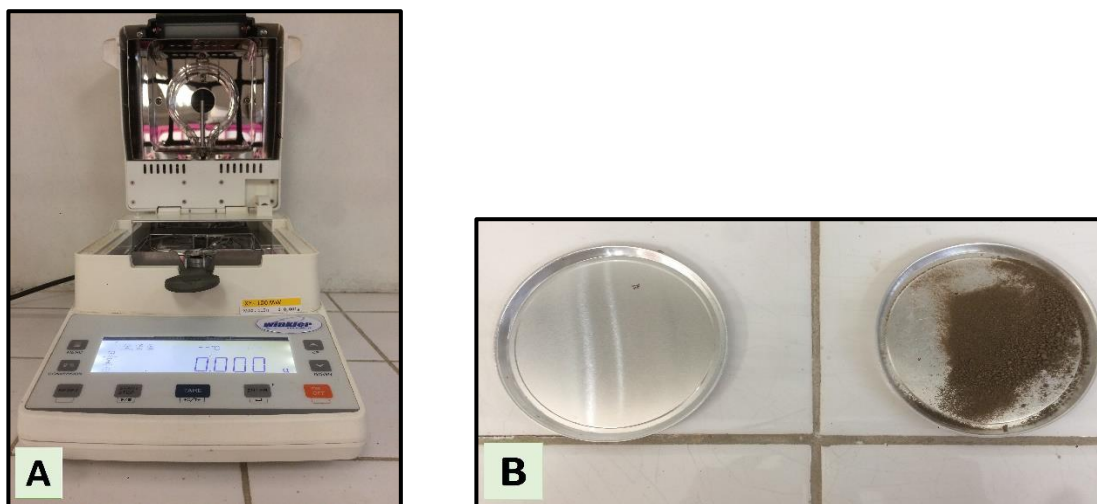


Figura 7. A. Balanza para determinar la humedad del suelo. **B.** Platillos de aluminio.

Finalmente, la muestra llega a una masa constante y mediante diferencia de masa se informa el porcentaje de humedad de la muestra. Este análisis se realizó diariamente al momento de realizar un ensayo, dado que la humedad del suelo varía con el tiempo.

2.5.2. Sistema de headspace acoplado a un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (HS-GC-FID)

La determinación de benceno en todas las muestras de suelo se realizó mediante un sistema de HS-GC-FID. Para la determinación de los parámetros del sistema se realizó una revisión bibliográfica donde se ha manipulado un sistema de HS-GC para la determinación de BTEX (Margesin y col., 2003; Ezquerro y col., 2004). A partir de estos parámetros se realizaron diversas modificaciones por medio de ciclos de ensayo y error para determinar las condiciones óptimas, donde finalmente se determinó que las condiciones óptimas del análisis para una buena y expedita separación en la cuantificación de benceno en muestras de suelo priorizando la simplicidad, rapidez y repetibilidad del método ocurría mediante la aplicación del siguiente método.

Se utilizó un Headspace Perkin Elmer Turbomatrix 16 (Figura 8A) como un sistema de muestreador automatizado para las muestras preparadas previamente en los viales. El vial fue expuesto a 80 °C en el horno del HS por 15 minutos, en seguida, el sistema automatizado insertó una aguja a 90 °C permitiendo la inyección de gas nitrógeno hasta alcanzar una presión de 14 psi permaneciendo en equilibrio durante 1 minuto. Por último, la muestra presurizada se transportó por medio del tubo de transferencia a una temperatura de 100 °C con el propósito de evitar pérdidas por condensación hasta ingresar al cromatógrafo de gases Perkin Elmer AutoSystem XL (Figura 8B) equipado con una columna Elite-5 de 5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano de proporciones 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm y un detector de ionización de llama (FID).

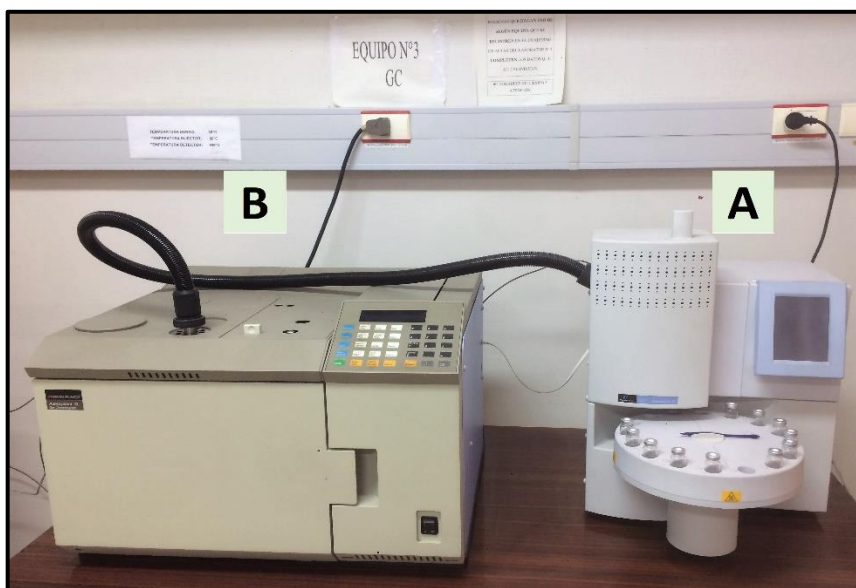


Figura 8. Sistema HS-GC-FID. **A.** Headspace. **B.** Cromatógrafo de gases.

El inyector del cromatógrafo se encontraba a una a una temperatura equivalente a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un sistema de inyección de muestra tipo *Split* y un flujo de 30 mL/min . Para efectuar el análisis cuantitativo de benceno en las muestras se aplicó una rampa de temperatura (Figura 9) donde se comenzó con una isoterma 1 a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, luego se continuó con una rampa de $30\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ hasta llegar a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ permaneciendo en esta temperatura por 1 minuto mediante la isoterma 2. El detector se programó a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un flujo de gas hidrógeno y de aire a 45 mL/min y 450 mL/min respectivamente. La presión del sistema fue de 12 psi. Los principales parámetros del método descrito se ilustran en la Figura 10.

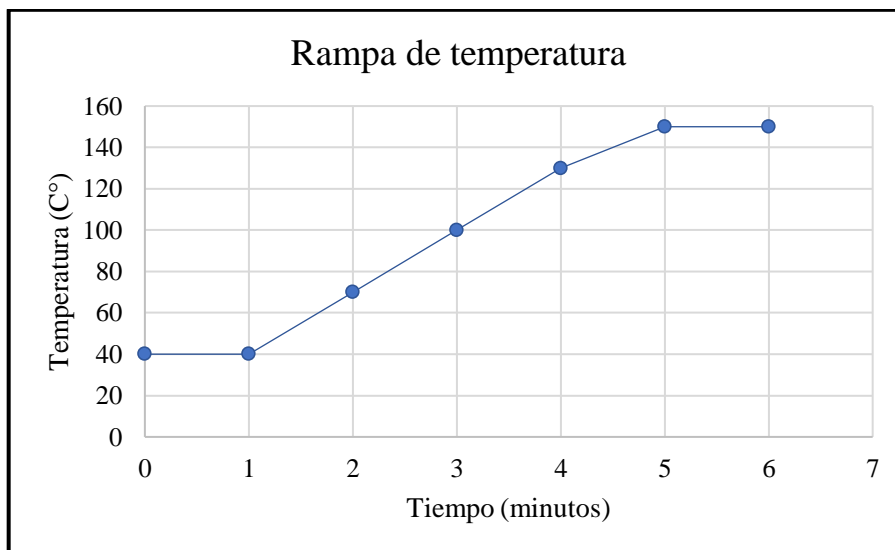


Figura 9. Rampa de temperatura utilizada en el análisis de benceno.

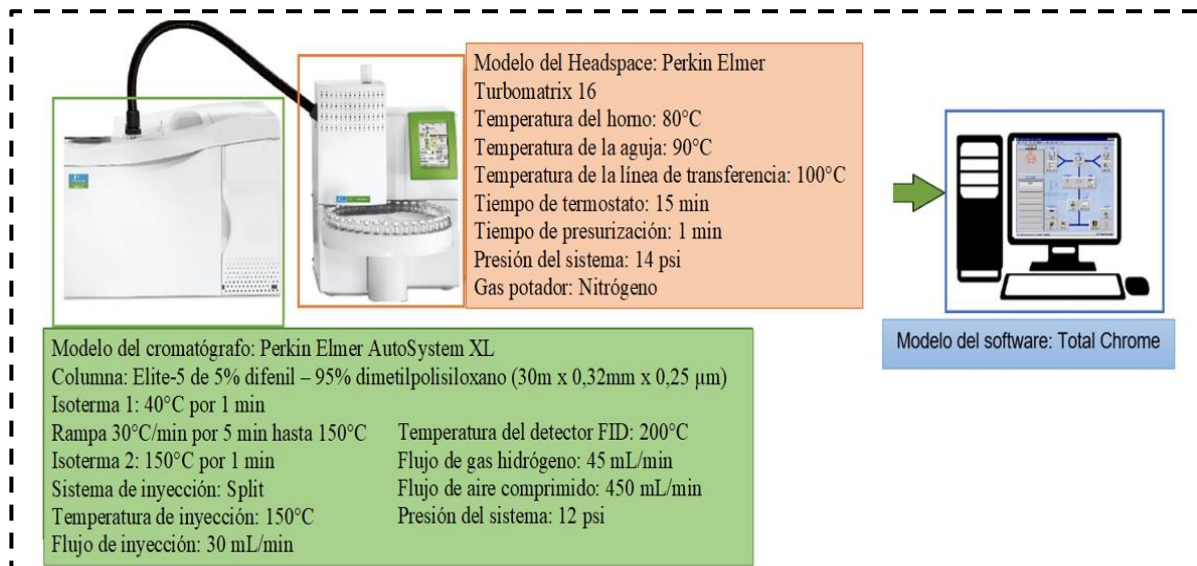


Figura 10. Esquema del sistema HS-GC-FID con sus respectivos parámetros de medición utilizado para la determinación de benceno.

2.6. Determinación de las curvas de calibrado

El rango para la determinación de benceno abarcó un intervalo entre 0,2 y 200 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$. Para ello, se construyó una curva de calibrado que comprendiera el total del rango indicado, demostrando una baja linealidad debido a la clara visualización de dos pendientes. Por lo tanto, se dividió el intervalo en dos subrangos, realizando en consecuencia dos curvas de calibrado: una de rango bajo utilizando un método sin atenuación de la señal eléctrica, y otra de rango alto de concentración con una atenuación en la detección eléctrica de 2^4 veces. Tanto la curva de rango bajo, como la de rango alto fueron realizadas tres veces, abarcando concentraciones entre 0,2 y 20 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$ y 1 y 200 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$ respectivamente. Finalmente, se promediaron las tres curvas individuales de cada rango para construir dos curvas de calibrado promedio, una de rango bajo y otra de rango alto.

2.6.1. Preparación de las soluciones estándar

Se prepararon soluciones estándar de benceno en agua a dos concentraciones distintas, para el caso de la curva de rango bajo se utilizó una solución de 120 $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$, mientras que para la curva de rango alto se empleó una solución de 1200 $\text{mg}\times\text{L}^{-1}$. Para ello, ambas soluciones fueron preparadas en un matraz de aforo de 100 mL con agua desionizada grado miliQ agregando con micropipetas el volumen respectivo de benceno Merck grado analítico de 13,7 μL y 137 μL respectivamente. Las soluciones se homogeneizaron por inversión 20 y 30 veces correspondientemente. Luego, se procedió a distribuir las soluciones estándar en 5 tubos de propileno de 15 mL, donde el contenido de cada tubo

fue distribuido secuencialmente en 3 tubos de propileno más pequeños de 1,7 mL, tal como se muestra en el esquema de la Figura 11.

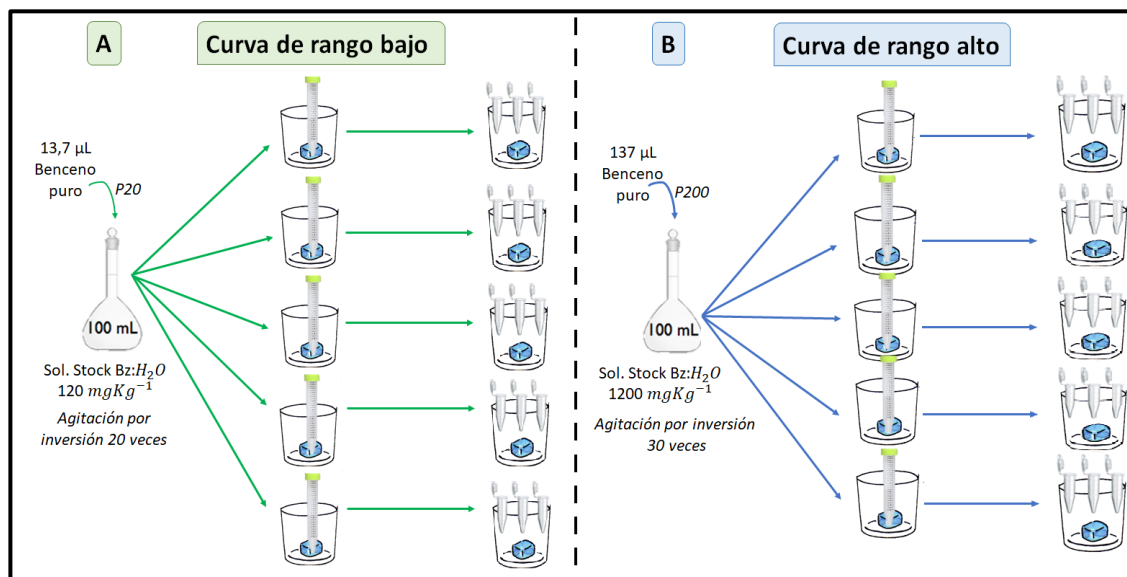


Figura 11. Esquema del procedimiento experimental implementado en la preparación de las soluciones estándar. **A.** Curva de rango bajo. **B.** Curva de rango alto.

Cada tubo fue refrigerado sobre un baño de hielo y aforado hasta alcanzar su máxima capacidad con el propósito de eliminar totalmente el espacio de cabeza y de esta manera evitar la pérdida de benceno por volatilización. Además, todo el procedimiento experimental que involucró la manipulación de las soluciones de benceno se realizó en el menor tiempo posible y a baja temperatura, utilizando en todo momento la caja de material aislante con hielo en su interior, tal como se ilustra en la Figura 12, con el propósito de evitar la volatilización del compuesto.

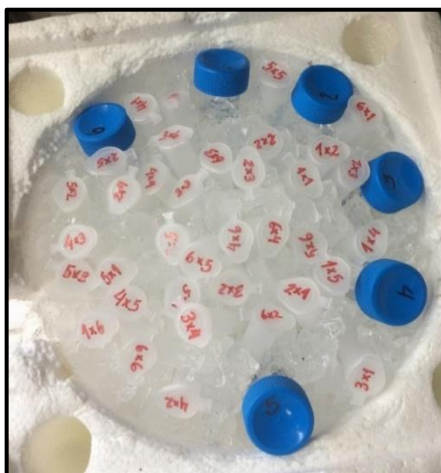


Figura 12. Caja aislante con hielo conteniendo el material de plástico.

2.6.2. Fortificación de los niveles de concentración de benceno en suelo

Se consideraron cinco niveles de concentración tanto en las curvas de calibrado de rango bajo, como de rango alto. En las curvas de calibrado de rango bajo se incluyeron los siguientes niveles de concentración: 0,2; 0,5; 2,5; 10; y 20 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$, mientras que en la curva de calibración de rango alto: 1; 5; 25; 100 y 200 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$. Cada nivel de concentración fue preparado por triplicado, para ello se consideró la solución estándar de benceno contenida en los 15 tubos de propileno de 1,7 mL completamente llenos, donde el contenido de cada tubo se utilizó para fortificar un único microcosmo, siendo el resto del volumen descartado.

Para efectuar la fortificación de los niveles de concentración de las curvas se adicionaron diferentes volúmenes de la respectiva solución estándar. En el caso de la curva de rango bajo se adicionaron los siguientes volúmenes de la solución estándar de $120 \text{ mg}\times\text{L}^{-1}$: 7,3; 18,2; 91; 360; 730 μL respectivamente, mientras que para la curva de rango alto se añadieron los volúmenes de la solución estándar de benceno de $1200 \text{ mg}\times\text{L}^{-1}$: 3,7; 18,3;

91; 370; 730 μL respectivamente, utilizando micropipetas de distintos volúmenes a un vial que contenía una masa de suelo seco con 4,38 g previamente masados mediante una balanza analítica Sartorius GMBH GÖTTINGEN, tal como se muestra en la Figura 13.

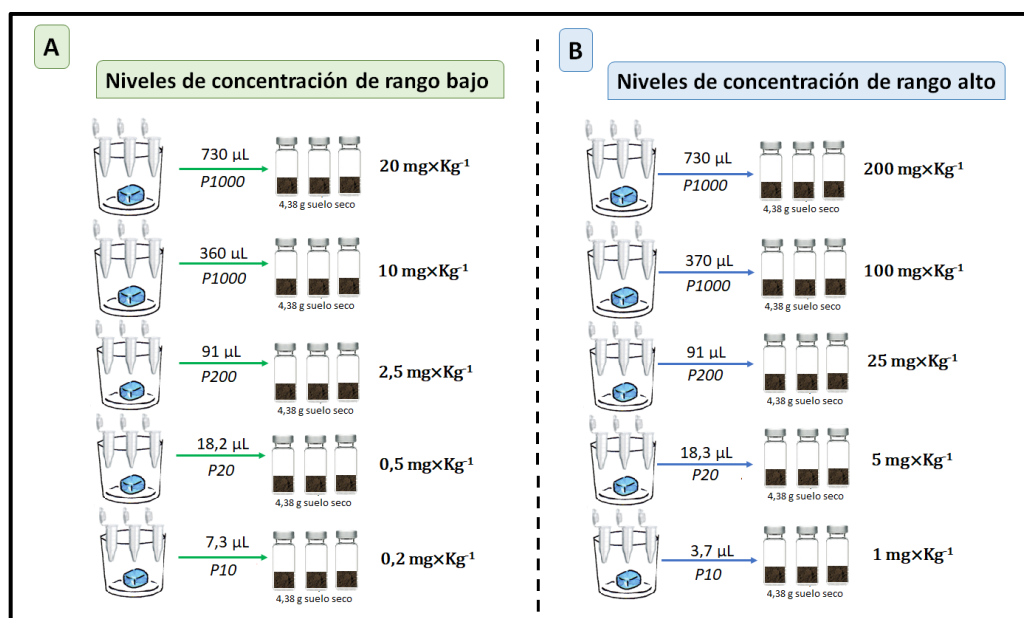


Figura 13. Esquema de la fortificación en los niveles de concentración de las curvas. **A.** Niveles de concentración en las curvas de rango bajo. **B.** Niveles de concentración en las curvas de rango alto.

Inmediatamente después de cada adición el vial fue sellado con la respectiva tapa de aluminio y septa de goma recubierta con teflón. El orden de dopaje adoptado consideró primero los niveles de benceno más concentrado con el propósito de evitar la volatilización de este.

El detalle de los niveles de concentración y volúmenes utilizados en la construcción de las curvas de calibrado de rango bajo y alto se señalan de forma resumida en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes empleados en la construcción de las curvas de calibrado.

Curvas de calibrado	Concentración de solución estándar (mg×L ⁻¹)	Volumen de solución estándar adicionado (μL)	Concentración final de benceno (mg×Kg ⁻¹ suelo seco)
Curva de calibrado de rango bajo	120	7,3	0,2
		18,2	0,5
		91	2,5
		360	10
		730	20
Curva de calibrado de rango alto	1200	3,7	1
		18,3	5
		91	25
		370	100
		730	200

2.7. Determinación de los parámetros de validación

Para efectuar la validación del método analítico se determinaron las siguientes figuras de mérito mediante sus respectivas metodologías.

2.7.1. Linealidad

Para evaluar la linealidad, se determinó el rango lineal de trabajo que describe la función de calibración a través de la respuesta del instrumento (variable dependiente) frente a la concentración del analito (variable independiente) utilizando el método de los mínimos cuadrados (Ecuación 1).

$$y = a + bx \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde,

y = Variable dependiente

x = Variable independiente

a = Intercepto

b = Pendiente de la regresión

El parámetro de linealidad de las curvas de calibrado de rango bajo y alto se evaluó en base al coeficiente de correlación (r) mediante la Ecuación 2, coeficiente de determinación (r^2) utilizando la Ecuación 3, y a través de la desviación estándar relativa (%RSD) en cada una de las curvas mediante el factor respuesta de cada nivel de concentración, utilizando la Ecuación 4.

$$r = \frac{\sum_i(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i(x_i - \bar{x})^2 \times \sum_i(y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde,

r = Coeficiente de correlación

x_i = Valores individuales de la variable independiente

\bar{x} = Promedio de la variable independiente

y_i = Valores individuales experimentales de la variable dependiente

\bar{y} = Promedio de la variable dependiente

$$r^2 = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde,

r^2 = Coeficiente de determinación

\hat{y}_i = Valores individuales estimados de la variable dependiente

\bar{y} = Promedio de la variable dependiente

y_i = Valores individuales experimentales de la variable dependiente

$$\%RSD = \frac{\sigma_{FR}}{\bar{x}_{FR}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde,

$\%RSD$ = Porcentaje de desviación estándar relativa

σ_{FR} = Desviación estándar de los factores de respuesta

\bar{x}_{FR} = Promedio de los factores de respuesta

2.7.2. Sensibilidad

La sensibilidad del método se evaluó mediante la magnitud de la pendiente (b) de las curvas de calibrado a través de la regresión de los mínimos cuadrados, aplicando la Ecuación 5.

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde,

b = Pendiente

y_i = Valores individuales experimentales de la variable dependiente

x_i = Variable independiente

\bar{x} = Promedio de la variable independiente

\bar{y} = Promedio de la variable dependiente

Así mismo, se determinó el intercepto de las curvas de calibrado mediante la Ecuación

6.

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde,

a = Intercepto

\bar{y} = Promedio de la variable dependiente

b = Pendiente

\bar{x} = Promedio de la variable independiente

2.7.3. Precisión en las curvas de calibrado

La precisión de la curva de calibrado se determinó en los todos niveles de las curvas construidas en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

2.7.3.1. Repetibilidad de las curvas de calibrado

La repetibilidad se determinó en cada curva de calibrado de forma independiente realizada en un mismo día, por un mismo analista, utilizando un mismo equipamiento y se evaluó

mediante el porcentaje del coeficiente de variación del triplicado construido en cada nivel de concentración (Ecuación 7).

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde,

σ = Desviación estándar del conjunto de datos

\bar{x} = Promedio del conjunto de datos

Se utilizó el porcentaje de coeficiente de Horwitz para cada nivel de concentración en condiciones de repetibilidad como criterio de aceptabilidad (Ecuación 8) (Sandoval, 2010).

$$\%CV_{Horwitz} = \frac{1}{2} \times 2^{1-(0,5 \cdot \log C)} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde,

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10

2.7.3.2. Reproducibilidad de las curvas de calibrado

La reproducibilidad en las curvas de calibrado se determinó en base a los niveles de concentración de las curvas promedio, las cuales fueron construidas a partir de las curvas de calibrado independientes realizadas en distintos días. Para ello, se evaluaron los porcentajes de coeficiente de variación de las señales obtenidas en cada nivel de concentración mediante la Ecuación 7. Así mismo, se consideró el porcentaje de coeficiente de variación de Horwitz para cada nivel de concentración en condiciones de reproducibilidad como criterio de aceptación (Ecuación 9) (Sandoval, 2010).

$$\%CV_{Horwitz} = \frac{2}{3} \times 2^{1-(0,5 \cdot \log C)} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde,

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10

2.7.3.3. Índices de repetibilidad (r) y de reproducibilidad (R)

El índice de repetibilidad (r) corresponde al valor máximo con una probabilidad del 95% que puede obtenerse de la diferencia absoluta entre dos resultados de pruebas individuales obtenidos en condiciones de repetibilidad (ISO 5725). Mientras que el índice de reproducibilidad (R) es el valor máximo que puede obtenerse con una probabilidad del 95% con respecto a la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales obtenidos en condiciones intermedias de ejecución (Boqué y col., 2002).

Los índices de repetibilidad y reproducibilidad fueron determinados utilizando la Ecuación 10 y 11 respectivamente en los niveles de concentración de las curvas de calibrado, mediante las desviaciones estándar de repetibilidad (S_r) y de reproducibilidad (S_R) calculadas por medio de la Ecuación 12 y 13 respectivamente.

$$r = 2,8 \times S_r \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde,

r = Límite de repetibilidad

S_r = Desviación estándar de repetibilidad

$$R = 2,8 \times S_R \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde,

R = Límite de reproducibilidad

S_R = Desviación estándar de reproducibilidad

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(S_{r1}^2 + S_{r2}^2 + S_{r3}^2)}{n}} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde,

S_r = Desviación estándar de repetibilidad

n = Número de datos

$$S_R = \sigma_{\bar{x}} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde,

S_R = Desviación estándar de reproducibilidad

$\sigma_{\bar{x}}$ = Desviación estándar de los promedios

El test de Fisher corresponde a una prueba de variabilidad estadística que da cuenta de los errores aleatorios de un conjunto de datos, mediante de la determinación del valor de Fisher experimental que está dado por la Ecuación 14.

$$F_{exp} = \frac{(S_{xy1})^2}{(S_{xy2})^2} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde,

F_{exp} = Valor de Fisher experimental

S_{xy1} = Varianza del conjunto de datos 1

S_{xy2} = Varianza del conjunto de datos 2

2.7.4. Precisión del método

La precisión del método se determinó a partir de los fortificados construidos en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad a distintos niveles de concentración.

2.7.4.1. Repetibilidad del método

La repetibilidad del método fue evaluada mediante el coeficiente de variación porcentual (Ecuación 7) de 5 réplicas de fortificados preparados dentro de un mismo día a una concentración de 29,9; 90,4 y 150,7 mg×Kg⁻¹ para la curva de rango alto de concentración y 12,6 mg×Kg⁻¹ para la curva de rango bajo. El porcentaje de coeficiente de variación de Horwitz en condiciones de repetibilidad (Ecuación 8) fue utilizado como criterio de aceptación para cada nivel de fortificado.

2.7.4.2. Reproducibilidad del método

La reproducibilidad del método se determinó por medio del porcentaje de coeficiente de variación (Ecuación 7) de las muestras de fortificados obtenidas en 5 días diferentes, preparados a una concentración de 29,9; 90,4 y 150,7 mg×Kg⁻¹ para la curva de rango alto

de concentración y $12,6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ para la curva de rango bajo. Se determinó el porcentaje de coeficiente de variación de Horwitz en condiciones de reproducibilidad (Ecuación 9) para cada nivel de fortificado como criterio de aceptación.

2.7.5. Exactitud

La exactitud del método se determinó a partir de la veracidad que considera al porcentaje de recuperación (Ecuación 15), sesgo (Ecuación 16) y error relativo (Ecuación 17) evaluados en las muestras fortificadas a distintos niveles de concentración utilizando un estándar analítico de benceno Dr. Ehrenstorfer GmbH, producto de que no se contaba con un material de referencia certificado (MRC) de benceno en suelo.

2.7.5.1. Recuperación

La recuperación de las muestras se expresa de forma porcentual considerando el cociente de la concentración experimental obtenida en el análisis, con respecto a la concentración teórica (Ecuación 15).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_e}{C_t} \times 100 \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde,

C_e = Concentración experimental

C_t = Concentración teórica

El criterio de aceptación de este parámetro depende directamente de la concentración del analito. La asociación de las comunidades analíticas (AOAC) establece un rango de porcentaje de recuperación de acuerdo con la concentración esperada del analito según la Tabla 6 (Sandoval, 2010).

Tabla 6. Criterio de aceptación para el porcentaje de recuperación dependiendo de la concentración del analito.

Rango de concentración	Recuperación estimada (%)
10% a 100%	98-102
1%	97-103
0,1%	95-105
100 mg×Kg ⁻¹	90-107
100 µg×Kg ⁻¹ a 10 mg×Kg ⁻¹	80-110
10 µg×Kg ⁻¹	60-115
1 µg×Kg ⁻¹	40-120

2.7.5.2. Sesgo y error relativo

El sesgo o error absoluto se determinó junto con el error relativo en cada uno de los niveles de fortificados, utilizando la Ecuación 16 y 17 respectivamente.

$$Ea = |\bar{x} - x_a| \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde,

Ea = Error absoluto

\bar{x} = Media de los valores experimentales

x_a = Valor aceptado de la cantidad medida

$$\%Er = \frac{Ea}{Vv} \times 100 \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde,

$\%Er$ = Error relativo

Ea = Error absoluto

Vv = Valor considerado como verdadero

Para evaluar el sesgo se debe realizar la prueba t student, donde el $t_{calc} < t_{crit}$ Para calcular el t_{calc} se aplica la Ecuación 18 a los valores obtenidos experimentalmente.

$$t_{calc} = \frac{x_a - \bar{x}}{\sigma / \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde,

t_{calc} = t calculado

X_α = Valor aceptado de la cantidad medida en concentración

\bar{X} = Media de los valores experimentales en concentración

σ = Desviación estándar

n = Número de valores observados

Así mismo, el valor de t criterio t_{crit} debe ser determinado por tabla considerando los grados de libertad y el nivel de confianza deseado ($1 - \alpha$). Particularmente, se trabajó con un valor de 95% de confianza.

2.7.6. Fortificación de los niveles de rango bajo y alto

Se construyeron 4 niveles de concentración para los fortificados. Uno de ellos a una concentración equivalente de $12,6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ para la curva de rango bajo. La muestra se construyó por triplicado a partir de una solución estándar de benceno en agua de $120 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ preparada de la misma manera en que se construyó la curva de rango bajo y añadiendo un volumen de $460 \mu\text{L}$ mediante micropipeta P1000 a una masa de suelo seco equivalente a $4,38 \text{ g}$, tal como se muestra en la Figura 14A. Los tres niveles de concentración de fortificados restantes se prepararon a una concentración equivalente de $29,9$; $90,4$ y $150,7 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$. Las muestras se construyeron por triplicado a partir de una solución estándar de benceno en agua de $1200 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ preparada de la misma manera que se construyó la curva de rango alto y añadiendo un volumen de 109 , 330 y $550 \mu\text{L}$ respectivamente a una masa de suelo $4,38 \text{ g}$ mediante micropipetas de distintos volúmenes, tal como se muestra en la Figura 14B.

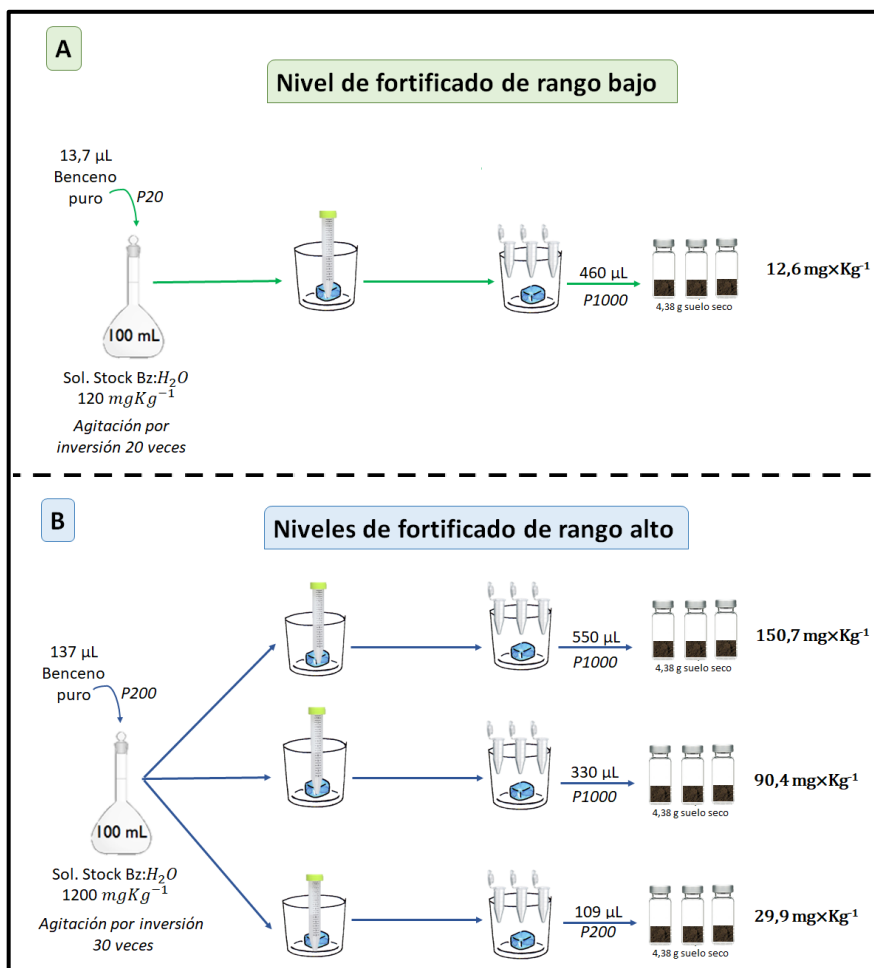


Figura 14. Esquema del procedimiento experimental para los fortificados. **A.** Niveles de fortificado de rango bajo. **B.** Niveles de fortificado de rango alto.

2.7.7. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron estadísticamente en las curvas de calibrado promedio de rango bajo y alto. Para ello, se utilizó la recta de regresión convencional para la calibración de las curvas, donde se aplicó el supuesto fundamental del método de los mínimos cuadrados donde cada punto en la representación gráfica tiene una variación distribuida normalmente, por ende, es apropiado utilizar el termino $S_{y/x}$ como la desviación estándar de la regresión en la estimación de los límites (Miller &

Miller, 2002) mediante la Ecuación 19. Así mismo, se determinó el valor del término S_0 que representa la desviación estándar del blanco por medio de la Ecuación 20.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde,

$S_{y/x}$ = Desviación estándar de la regresión

y_i = Valores individuales experimentales de la variable dependiente

\hat{y}_i = Valores individuales estimados de la variable dependiente

n = Número de datos

$$S_0 = \frac{S_{y/x}}{A} \times \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{M} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde,

S_0 = Desviación estándar del blanco

$S_{y/x}$ = Desviación estándar de la regresión

A = Pendiente de la curva de calibrado

M = Número total de muestras

\bar{x}^2 = Concentración media de calibrado

Q_{xx} = Suma de los cuadrados de los niveles de concentración

Posteriormente, se determinaron los valores de los límites de detección y cuantificación en las curvas de calibrado promedio de rango bajo y alto utilizando las Ecuaciones 21 y 22 respectivamente.

$$LD = 3,28 \times S_0 \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde,

LD = Límite de detección

S_0 = Desviación estándar del blanco

$$LC = 10 \times S_0 \quad \text{Ecuación 22}$$

Donde,

LC = Límite de cuantificación

S_0 = Desviación estándar del blanco

2.8. Biorremediación

2.8.1. Condiciones experimentales del ensayo

Se efectuó un ensayo de bioaumentación mediante la construcción de microcosmos en viales de 20 mL utilizados para análisis de headspace, donde cada vial contenía 4,38 g de suelo masados en una balanza analítica Sartorius GMBH GÖTTINGEN. Posteriormente, fueron fortificados con benceno a una concentración final de $200 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ bajo siete condiciones diferentes (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones del ensayo de biorremediación.

Condiciones	Benceno*	Bacteria	HgCl ₂ **	Motivo
Control abiótico	+	-	-	Controlar la pérdida abiótica de benceno
Control 1	+	-	-	Controlar la remoción de benceno por parte del microbioma nativo
Control 2	+	-	+	Controlar la remoción de benceno por parte del microbiano nativo en presencia de mercurio
Experimento 1	+	MSR33	-	Biorremediación de benceno en suelo con <i>C. metallidurans</i> MSR33
Experimento 2	+	MSR33	+	Biorremediación de benceno en suelo con mercurio utilizando <i>C. metallidurans</i> MSR33
Referencia 1	+	JMP134	-	Biorremediación de benceno en suelo con <i>C. pinatubonensis</i> JMP134
Referencia 2	+	JMP134	+	Biorremediación de benceno en suelo con mercurio utilizando <i>C. pinatubonensis</i> JMP134

* Benceno: $200 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$; ** Mercurio: $2 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$

Tres de ellas correspondieron a muestras controles que daban cuenta de la pérdida abiótica de benceno utilizando el suelo en condiciones de esterilidad (Control abiótico), remoción de benceno por parte del microbioma nativo del suelo (Control 1) y la remoción de benceno por parte del microbioma nativo en un suelo contaminado con mercurio (Control 2). Además, se consideró la biorremediación de benceno en suelo por parte de la bacteria *C. metallidurans* MSR33 (Experimento 1), y en suelo contaminado con mercurio

(Experimento 2). Como referencia se utilizó la bacteria *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 para evaluar la remoción de benceno en suelo (Referencia 1), y en suelo con mercurio (Referencia 2).

2.8.2. Fortificación del suelo con mercurio

Para el presente estudio se prepararon microcosmos con suelo contaminado con $2 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de mercurio. Para ello, se masaron 500 g de suelo agrícola y se le adicionó 5 mL de una solución de $200 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de Hg (II) preparada a partir de la sal HgCl_2 . La mezcla fue homogeneizada por 10 minutos utilizando una varilla de vidrio estéril. Posteriormente, la mezcla homogeneizada se dejó secar por 1 a 7 días bajo temperatura ambiente en un medio estéril para permitir la evaporación de agua. Finalmente, se ajustó la humedad del suelo a un valor cercano a la humedad de la muestra original rociándolo con agua ultra pura estéril. Se utilizó este suelo para todos los ensayos realizados en microcosmos de suelo contaminado con mercurio.

2.8.3. Preparación de la solución de benceno y posterior dopaje de los microcosmos

Para la construcción de los microcosmos se masaron 4,38 g de suelo en 105 viales de 20 mL para headspace utilizando una balanza analítica Sartorius GMBH GÖTTINGEN. Adicionalmente, se prepararon 7 soluciones estándar de benceno en agua a una concentración de $1200 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ que fueron preparadas de la misma forma descrita en el apartado 2.6.1. Se utilizaron 730 μL de esta solución estándar para fortificar todos los microcosmos con el propósito de obtener una concentración final de $200 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de benceno en suelo.

2.8.4. Inoculación de los microcosmos utilizando las bacterias

Los microcosmos de las condiciones experimentales y de referencia fueron inoculados utilizando las bacterias *C. metallidurans* (MSR33) y *C. pinatubonensis* (JMP134) respectivamente. Para ello, se adicionaron 50 μL de un inóculo de la cepa bacteriana correspondiente preparado a partir de un cultivo lavado y resuspendido en agua ultra pura, de forma tal de obtener una población de 1×10^8 UFC $\times\text{g}^{-1}$ en suelo seco sobre el microcosmos, para el caso de los controles se adicionó el mismo volumen, pero de agua ultra pura estéril.

2.8.5. Tiempos de muestreo

El ensayo consideró 5 tiempos de muestreo donde cada condición fue medida por triplicado, por lo tanto, se construyeron 15 microcosmos por cada condición determinada. Luego de fortificar las muestras, estas se dispusieron inmediatamente en un baño termostático Thermo Scientific a una temperatura constante de 24 °C durante todo el tiempo de ensayo, tal como se muestra en la Figura 15.



Figura 15. Muestras del ensayo de biorremediación dispuestas en el baño termostático.

Para el seguimiento de la cinética de remoción de benceno el tiempo 0 horas fue considerado como teórico, mientras que las muestras experimentales fueron medidas en

forma sacrificial durante 5 tiempos: 24, 36, 48, 60, 72 horas, tal como se muestra en la Figura 16.

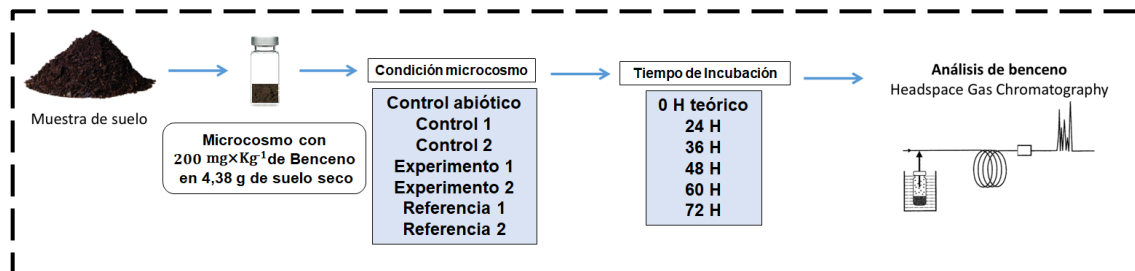


Figura 16. Esquema resumen del procedimiento experimental aplicado en el ensayo de biorremediación.

Luego de transcurrir el periodo de tiempo correspondiente se procedió a sacar los microcosmos del baño termostático para proceder con el análisis de benceno residual que se efectuó mediante el sistema HS-GC-FID utilizando el método ya validado.

2.8.6. Determinación de la concentración de benceno

Para cuantificar el benceno remanente en el suelo dentro del proceso de biorremediación se utilizó el mismo vial en el cual fueron preparados los microcosmos. Las muestras fueron analizadas por triplicado de manera sacrificial a distintos tiempos e ingresadas inmediatamente al sistema HS-GC-FID, luego de ser retiradas del baño termostático. En todos los casos, para la determinación de benceno se utilizó la curva de rango alto hasta que se obtuviera una señal inferior al límite de cuantificación del rango alto. De esta manera, las muestras que entregaron una concentración inferior al límite de cuantificación del rango alto se analizaron posteriormente utilizando el método de determinación de rango bajo, de forma que la concentración de benceno remanente se determinó por interpolación en la curva de rango bajo.

III. RESULTADOS

3.1. Validación del método analítico

Para efectuar la validación del método analítico se determinaron las figuras de mérito de manera independiente en la curva de calibrado de rango bajo y alto.

3.1.1. Selectividad

Para evaluar la selectividad del método se realizó una comparación cromatográfica de una muestra matriz contra una muestra matriz fortificada con benceno, tal como se muestra en la Figura 17.

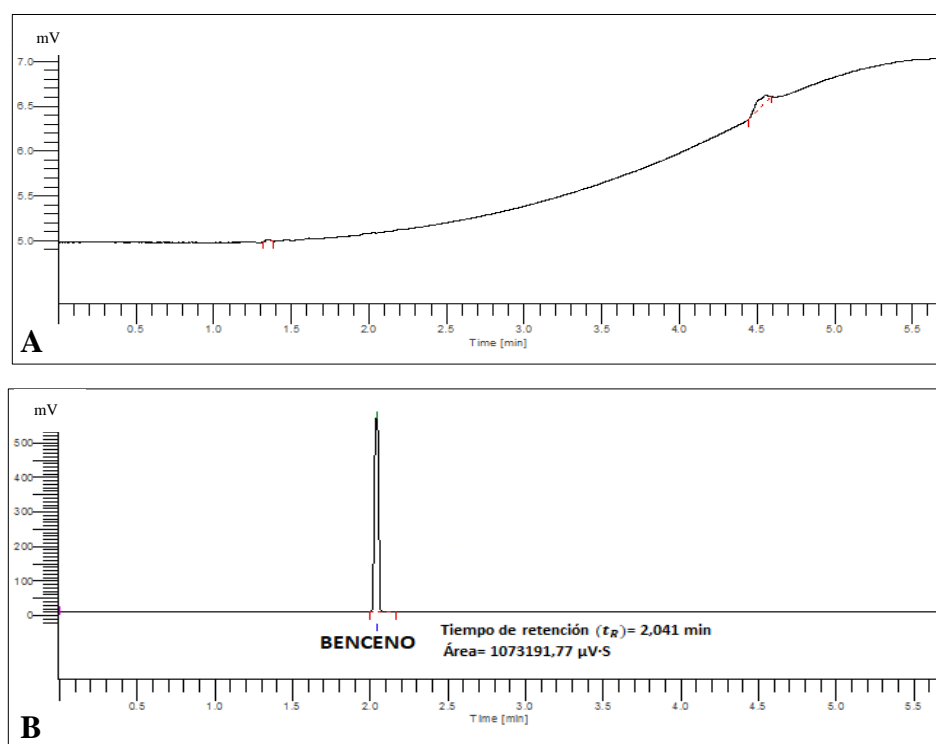


Figura 17. Comparación cromatográfica entre la matriz de suelo (A. Cromatograma superior, amplificado 100 veces) con respecto a la matriz de suelo fortificado con 200 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$ de benceno (B. Cromatograma inferior sin amplificar).

La Figura 17 muestra la evaluación de la selectividad del método que se determinó mediante el análisis de compuestos interferentes que pueden estar presente en la región de interés donde se encuentra el analito. En el cromatograma inferior se observa que el tiempo de retención del benceno corresponde a los 2,04 minutos ($t_R = 2,04$ min), donde se muestra que no existen interferencias en la región de interés, considerando que no se manifiesta ningún pico proveniente de algún compuesto interferente.

3.1.2. Linealidad

Se determinó el coeficiente de correlación (r) por medio de la correlación de Pearson aplicando la Ecuación 2 a los valores experimentales de la señal de benceno (y_i) y sus respectivos niveles de concentración (x_i), tal como se muestra en el Anexo 2. En la Tabla 8 se señalan los valores de los coeficientes de correlación determinados en todas las curvas de calibrado y el intervalo de trabajo involucrado en las curvas de rango bajo y alto.

Tabla 8. Coeficientes de correlación (r) obtenidos en las curvas de rango bajo y alto.

Parámetro analítico	Curva de rango bajo				Curva de rango alto			
	C_1	C_2	C_3	$C_{\bar{x}}$	C_1	C_2	C_3	$C_{\bar{x}}$
$r_{Experimental}$	1,000	1,000	1,000	1,000	0,999	0,999	0,999	0,999
$r_{Criterio de aceptación}$	$r > 0,99$							
Intervalo de trabajo ($mg \times Kg^{-1}$)	0,2 – 20				1 – 200			

En la Tabla 8 se observa que el coeficiente de correlación de Pearson (r) en las curvas de rango bajo tienen un valor igual a 1,000, mientras que en las curvas de rango alto muestran valores de r equivalente a 0,999. Esto indica que existe una alta relación positiva entre las señales de benceno y sus respectivos niveles de concentración, dado que suele

considerarse como tal a partir de valores de r igual o superiores a 0,99 (Sandoval, 2010). Así mismo, en la Tabla 8 se muestra el intervalo de trabajo que se utilizaron en las curvas de calibrado, es decir, el rango de concentraciones donde se determinó la relación lineal entre la respuesta del instrumento y la concentración del analito.

La linealidad se evaluó mediante el coeficiente de determinación (r^2) que fue determinado en todas las curvas de calibrado, relacionando los valores de la variable dependiente obtenidos experimentalmente (y_i) con respecto a los ajustados (\hat{y}_i) mediante la Ecuación 3, tales cálculos se exponen en el Anexo 3. En la Tabla 9 se muestran los valores de los coeficientes de determinación obtenidos en todas las curvas de calibrado.

Tabla 9. Coeficientes de determinación (r^2) obtenidos en las curvas de rango bajo y alto.

Parámetro analítico	Curva de rango bajo				Curva de rango alto			
	C_1	C_2	C_3	$C_{\bar{x}}$	C_1	C_2	C_3	$C_{\bar{x}}$
$r^2_{Experimental}$	1,000	1,000	1,000	1,000	0,999	0,999	0,999	0,999
$r^2_{Criterio de aceptación}$	$r^2 > 0,95$							
Intervalo de trabajo ($mg \times Kg^{-1}$)	0,2 – 20				1 – 200			

La Tabla 9 refleja que los valores del coeficiente de determinación (r^2) en las curvas de rango bajo alcanzan un valor de 1,000, mientras que en las curvas de rango alto poseen un valor equivalente a 0,999. Esto refleja una alta relación lineal positiva entre las señales de benceno y sus respectivos niveles de concentración. Para el caso de la especificación de este parámetro en la validación, el valor de r^2 mínimo que asegura la linealidad del método debería ser mayor a 0,95 (Suarez y col., 2009). Por lo tanto, se cumple el criterio de

aceptabilidad de la linealidad señalando que el modelo entrega una respuesta lineal en el rango estudiado.

Por último, se determinaron los valores de la desviación estándar relativa (%RSD) de los factores respuestas como otro parámetro de validación para evaluar la linealidad. Para ello, se determinaron primero los factores respuestas de cada curva efectuando la razón entre la señal de benceno obtenida con respecto a los niveles de concentración, mediante la Ecuación 4, tal como se muestra en el Anexo 4. La Tabla 10 expone los valores de las %RSD obtenidos en todas las curvas de calibrado.

Tabla 10. Desviación estándar relativa (%RSD) obtenidas en las curvas de rango bajo y alto.

Parámetro analítico	Curva de rango bajo				Curva de rango alto			
	C ₁	C ₂	C ₃	C _{\bar{x}}	C ₁	C ₂	C ₃	C _{\bar{x}}
%RSD _{Experimental}	1,91	0,57	1,26	0,90	3,36	4,56	3,31	3,61
%RSD _{Criterio de aceptación}	< 5%							
Intervalo de trabajo (mg×Kg ⁻¹)	0,2 – 20				1 – 200			

En la Tabla 10 se observa que todos los valores de las %RSD experimentales no sobrepasaron el valor de criterio aceptado por la USEPA donde se establece que el valor %RSD de los factores respuesta deben ser menor al 5% (USEPA, 1996).

A partir de la evaluación de los tres parámetros que dan cuenta de la linealidad se demuestra el cumplimiento de la especificación para todas las curvas de rango bajo y alto, por tanto, el método cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo.

3.1.3. Sensibilidad

La sensibilidad del método es evaluada por medio de la pendiente (b) de las curvas de calibrado. Para ello, fue necesario determinar las rectas de regresión que describen las gráficas de calibrado, mediante el método de los mínimos cuadrados utilizando la Ecuación 5 y 6, al relacionar los valores experimentales de la señal de benceno como variable dependiente (y_i), con respecto a las concentraciones de benceno como variable independiente (x_i), tal como se muestra en el Anexo 5. En la Tabla 11 se muestran los valores de las pendientes, intercepto y errores asociados para las curvas de calibrado.

Tabla 11. Componentes de las rectas de calibrado de las curvas de rango bajo y alto. Pendiente (b), intercepto (a), desviación estándar de la pendiente (S_b) y desviación estándar del intercepto (S_a).

Parámetro analítico	Curva de rango bajo				Curva de rango alto			
	C_1	C_2	C_3	$C_{\bar{x}}$	C_1	C_2	C_3	$C_{\bar{x}}$
Pendiente (b)	84843,43	87028,29	89374,67	87082,13	5328,08	5350,50	5310,90	5329,83
Intercepto (a)	479,71	368,12	194,57	347,47	5583,31	5792,16	5901,95	5759,14
$S_{\frac{y}{x}}$	2834,64	1457,91	4880,34	1162,15	11009,43	10198,57	10257,24	9571,12
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	167,82	86,31	288,93	68,80	50,91	47,16	47,44	44,26
Desviación estándar del intercepto (S_a)	1684,67	866,46	2900,46	690,68	5138,70	4760,22	4787,61	4467,36
Atenuación de la señal	Sin atenuación				2^4 veces			

En el Anexo 6 se muestra la representación gráfica de la regresión lineal para la curva promedio de rango bajo y alto.

3.1.4. Precisión en las curvas de calibrado

La precisión en las curvas de calibrado se evaluó por medio de la repetibilidad y reproducibilidad de las mismas.

3.1.4.1. Repetibilidad en las curvas de calibrado

La repetibilidad de las curvas se evaluó de forma independiente en cada una de las tres curvas de calibrado de rango bajo y alto, ya que cada una de ellas se prepararon en condiciones de repetibilidad. Para ello, se determinó el porcentaje de coeficiente de variación experimental ($\%CV_{Experimental}$) en cada nivel de concentración a partir de muestras construidas por triplicado por medio de la Ecuación 7, este valor se comparó con el valor del coeficiente de variación de Horwitz ($\%CV_{Horwitz}$) de repetibilidad calculado mediante la Ecuación 8 en cada nivel de concentración, tal como se muestra en el Anexo 7. En la Tabla 12 y 13 se muestran los valores de $\%CV$ obtenidos en los niveles de concentración de las curvas de calibrado de rango bajo y alto respectivamente.

Tabla 12. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de repetibilidad obtenidos en las tres curvas de calibrado de rango bajo.

Concentración ($\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$)	$\%CV_{Experimental}$			$\%CV_{Horwitz}$ (Máximo permitido)
	C₁	C₂	C₃	
0,2	0,14	2,80	0,57	10,19
0,5	2,06	1,68	1,39	8,88
2,5	4,20	0,73	0,82	6,97
10	0,92	0,45	0,14	5,67
20	0,18	1,44	0,41	5,10

Tabla 13. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de repetibilidad obtenidos en las tres curvas de calibrado de rango alto.

Concentración (mg×Kg ⁻¹)	%CV _{Experimental}			%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)
	C ₁	C ₂	C ₃	
1	4,37	2,73	3,07	7,98
5	0,95	2,77	2,24	6,28
25	1,25	1,12	0,47	4,93
100	1,86	0,38	0,92	3,99
200	0,67	0,43	1,71	3,60

En las Tablas 12 y 13 se observa que todos los porcentajes de coeficiente de variación obtenidos en cada nivel de concentración se encuentran por debajo del valor criterio designado por Horwitz en las respectivas concentraciones.

3.1.4.2. Reproducibilidad en las curvas de calibrado promedio

La reproducibilidad se evaluó en la curva promedio de rango bajo y alto a partir de las tres curvas individuales realizadas en distintos días, es decir, bajo condiciones de reproducibilidad. Para ello, se determinó el valor del %CV_{Experimental} en cada nivel de concentración considerando las señales de las tres curvas independientes obtenidas en diferentes días mediante la Ecuación 7, este valor se comparó con respecto al %CV_{Horwitz} calculado en condiciones de reproducibilidad mediante la Ecuación 9 en cada nivel de concentración, tal como se muestra en el Anexo 8. En la Tabla 14 y 15 se exhiben los valores de %CV obtenidos en cada curva de calibrado promedio de rango bajo y alto respectivamente.

Tabla 14. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de reproducibilidad obtenidos en la curva promedio de calibrado de rango bajo.

Concentración (mg×Kg ⁻¹)	%CV (<i>Experimental</i>)	%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)
0,2	1,96	13,59
0,5	3,73	11,84
2,5	3,72	9,30
10	1,94	7,56
20	2,73	6,80

Tabla 15. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en condiciones de reproducibilidad obtenidos en la curva promedio de calibrado de rango alto.

Concentración (mg×Kg ⁻¹)	%CV (<i>Experimental</i>)	%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)
1	2,85	10,64
5	0,23	8,37
25	0,63	6,57
100	0,52	5,32
200	0,37	4,80

En las Tablas 14 y 15 se observa que todos los porcentajes de coeficiente de variación experimentales se encuentran dentro del valor criterio establecido por Horwitz en las respectivas concentraciones, tanto en las curvas de rango bajo como alto.

3.1.4.3. Índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R)

De igual manera, la precisión de las curvas fue evaluada mediante los índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R), los cuales fueron obtenidos utilizando las Ecuaciones 10 y 11, a partir de las desviaciones estándar de repetibilidad y

reproducibilidad calculadas mediante las Ecuaciones 12 y 13 respectivamente, tal como se muestra en el Anexo 9. En la Tabla 16 se observan los valores de las desviaciones e índices obtenidos.

Tabla 16. Índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R).

Curva de calibrado	Índices de repetibilidad			Índices de reproducibilidad		
	$\Sigma\sigma^2$	S_r	r	$\sigma_{\bar{x}}$	S_R	R
Bajo	2,6E+09	22852,3	63986,32	735466,7	735466,7	2059306,66
Alto	2,5E+07	2241,8	6277,13	452647,5	452647,5	1267413,02

En la Tabla 16 se muestra el valor del índice de reproducibilidad indicando que la magnitud de la diferencia existente entre los niveles de concentración en cada curva debe ser menor o igual a 2059306,66 en el caso del rango bajo, e inferior o igual a 1267413,02 en los valores de la curva de rango alto. Al calcular la diferencia considerando todas las combinaciones posibles en cada curva independiente se comprobó que ningún valor supera los índices de reproducibilidad respectivos ($\leq 2059306,66$ en el rango bajo; $\leq 1267413,02$ en el rango alto) tal como se observa en el Anexo 10. Por tanto, bajo este parámetro existe reproducibilidad en ambas curvas de calibrado.

Por otro lado, la Tabla 16 indica que la diferencia que debe existir entre las señales de cada curva no debe superar el valor del índice de repetibilidad tabulado ($\leq 63986,32$ en el rango bajo; $\leq 6277,13$ en el rango alto). Esto se cumple en cada nivel de concentración, a excepción del estándar de $20 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en la curva de rango bajo donde se observa que la diferencia entre las curvas 1 y 3 supera el valor del índice de repetibilidad, como se muestra en la Tabla 17. Mientras que en la curva de rango alto la diferencia del estándar de $200 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en la curva 2 y 3 sobrepasó el valor del índice de repetibilidad, como se

muestra en la Tabla 18, lo que reflejaría un incumplimiento en el parámetro de repetibilidad dentro de las curvas.

Tabla 17. Diferencia de cada nivel de concentración entre las curvas de calibrado de rango bajo.

Concentración mg×Kg ⁻¹ Combinaciones	0,2	0,5	2,5	10	20
	Curva 1 - Curva 2	185,32	1583,82	8735,78	15400,69
Curva 1 - Curva 3	488,72	3280,38	16205,53	33189,91	95203,81
Curva 2 - Curva 3	674,05	1696,56	7469,75	17789,22	49069,38
Criterio de aceptación: Índice de repetibilidad (r)	≤ 63986,32				

Tabla 18. Diferencia de cada nivel de concentración entre las curvas de calibrado de rango alto.

Concentración mg×Kg ⁻¹ Combinaciones	1	5	25	100	200
	Curva 1 - Curva 2	272,27	98,06	37,56	5757,07
Curva 1 - Curva 3	12,91	27,12	1564,02	2198,74	4764,36
Curva 2 - Curva 3	259,36	125,18	1526,46	3558,33	7911,21
Criterio de aceptación: Índice de repetibilidad (r)	≤ 6277,13				

No obstante, para corroborar esta información se aplicaron test de Fisher en ambos rangos, donde se comprueba si existe una variabilidad significativa entre las curvas 1 y 3 en el caso del rango bajo y en la curva 2 y 3 en el caso del rango alto. Para ello, se comprueba si las varianzas de ambas muestras difieren, planteando la siguiente hipótesis “No existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de calibración”. Para que esta hipótesis sea veraz, el valor obtenido ha de ser menor que el valor tabulado ($F_{Exp} <$

F_{Tabla}). Se realizaron dos test de Fisher (Tabla 19), donde se calcularon los F_{Exp} mediante la Ecuación 14 considerando las desviaciones estándar de las curvas a comparar. Mientras que el valor tabulado de F_{Tabla} se obtuvo considerando un p-valor equivalente 0,05 para un contraste de una cola y n-1 grados de libertad (Anexo 11).

Tabla 19. Test de Fisher aplicado a las curvas de rango bajo y alto.

	<i>Test de Fisher curva de rango bajo</i>		<i>Test de Fisher curva de rango alto</i>	
	Curva 1	Curva 3	Curva 2	Curva 3
$S_{\frac{y}{x}}$	2834,64	4880,34	10198,57	10257,24
$S_{\frac{y}{x}}^2$	8035159,90	23817735,96	104010759,67	105210944,57
F_{Exp}	2,96		1,01	
F_{Tabla}	6,39			
Resumen	$F_{Exp} < F_{Tabla}$		$F_{Exp} < F_{Tabla}$	

La Tabla 19 muestra que los valores experimentales de Fisher resultaron inferiores al tabulado, por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de calibración involucradas, indicando que existe repetibilidad en las curvas de calibrado de rango bajo y alto.

3.1.5. Precisión del método

La precisión del método se evaluó mediante cuatro muestras de fortificado, una de ellas de concentración $12,6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ para el rango bajo y las tres restantes de concentraciones 29,9; 90,4 y $150,7 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ para el rango alto, preparadas tanto en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

3.1.5.1. Repetibilidad del método

La repetibilidad del método se evaluó mediante cinco réplicas por cada nivel de fortificado preparado en condiciones de repetibilidad. En la Tabla 20 se muestran las concentraciones experimentales de las réplicas obtenidas mediante la interpolación de las señales para todos los niveles de fortificados en las respectivas curvas de calibrado promedio utilizando la Ecuación 1. A partir de estas concentraciones experimentales se determinó el coeficiente de variación experimental utilizando la Ecuación 7 como se muestra en el Anexo 12.

Tabla 20. Coeficientes de variación obtenidos en los cuatro niveles de fortificado en condiciones de repetibilidad.

	Curva de rango bajo	Curva de rango alto		
Concentración real (mg×Kg ⁻¹)	12,6	29,9	90,4	150,7
N° de réplicas	Concentración experimental (mg×Kg ⁻¹)			
1	12,36	29,36	92,42	147,63
2	13,39	29,61	90,18	147,59
3	13,34	30,17	95,82	148,34
4	12,98	30,37	90,27	151,57
5	12,40	30,42	97,18	148,03
%CV _{Experimental}	3,85	1,58	3,44	1,12
%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)	5,46	4,80	4,06	3,76

En la Tabla 20 se observa que los coeficientes de variación resultaron tener un valor equivalente a 3,85%, 1,58%, 3,44% y 1,12% respectivamente, mientras que el porcentaje límite según el coeficiente de Horwitz en condiciones de repetibilidad asociado a estas concentraciones no debe superar el 5,46%, 4,80%, 4,06% y 3,76% respectivamente. Por

tanto, los coeficientes de variación obtenidos a partir de las concentraciones experimentales de todos los fortificados no superaron los valores límites que propone Horwitz para cada concentración.

3.1.5.2. Reproducibilidad del método

La reproducibilidad del método fue evaluada a través de los cuatros niveles de fortificado. Para ello, se prepararon tres réplicas de cada nivel de fortificado dentro de cinco días diferentes. En la Tabla 21 se muestran las concentraciones experimentales de los cinco días diferentes para todos los niveles de fortificados obtenidos mediante la interpolación de las señales de cada día en las respectivas curvas de calibrado promedio utilizando la Ecuación 1. A partir de estas concentraciones experimentales se determinó el coeficiente de variación experimental utilizando la Ecuación 7, tal como se muestra en el Anexo 13.

Tabla 21. Coeficientes de variación obtenidos en los cuatros niveles de fortificado en condiciones de reproducibilidad.

	Curva de rango bajo	Curva de rango alto		
Concentración real (mg×Kg ⁻¹)	12,6	29,9	90,4	150,7
Días	Concentración experimental (mg×Kg ⁻¹)			
1	11,80	31,37	97,55	156,06
2	12,91	31,77	92,53	148,72
3	13,35	30,86	90,52	149,61
4	13,29	31,99	97,34	151,51
5	13,07	30,32	90,96	147,85
%CV _{Experimental}	4,91	2,18	3,66	2,17
%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)	7,28	6,40	5,41	5,01

En la Tabla 21 se observa que los coeficientes de variación resultaron tener un valor equivalente a 4,91%, 2,18%, 3,66% y 2,17% respectivamente, mientras que el porcentaje límite según el coeficiente de Horwitz en condiciones de reproducibilidad asociado a estas concentraciones no debe superar el 7,28%, 6,40%, 5,41% y 5,01% respectivamente.

3.1.6. Exactitud

3.1.6.1. Análisis de recuperación

La exactitud del método se evaluó a través del análisis de recuperación que implicó determinar el porcentaje de recuperación obtenido en las muestras a cuatro niveles de fortificado, $12,6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ para el rango bajo y 29,9; 90,4 y $150,7 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ para el rango alto, considerando la concentración teórica y la experimental. Para ello, se consideraron las concentraciones experimentales de los cuatro niveles de fortificados construidos en condiciones de repetibilidad obtenidas tras la interpolación de las señales en la curva promedio respectiva mediante la Ecuación 1. En la Tabla 22 se exhiben las concentraciones experimentales de los niveles de fortificados, así como los porcentajes de recuperación asociados que fueron obtenidos al relacionar la concentración teórica con la concentración experimental media utilizando la Ecuación 15.

Tabla 22. Análisis de recuperación de los cuatros niveles de fortificado.

	Curva de rango bajo	Curva de rango alto		
Concentración teórica (mg×Kg ⁻¹)	12,6	29,9	90,4	150,7
Concentración experimental (mg×Kg ⁻¹)	12,36	29,36	92,42	147,63
	13,39	29,61	90,18	147,59
	13,34	30,17	95,82	148,34
	12,98	30,37	90,27	151,57
	12,40	30,42	97,18	148,03
Concentración media experimental (mg×Kg ⁻¹)	12,89	29,99	93,18	148,63
<i>% Recuperación</i>	102,33	100,40	103,05	98,63
<i>Criterio de aceptación % Recuperación</i>	80 - 110%			90 - 107 %

En la Tabla 22 se observa que la concentración media experimental alcanzó un valor equivalente a 12,89; 29,99; 93,18 y 148,63 mg×Kg⁻¹, a partir de este valor y considerando la concentración teórica, se calculó el porcentaje de recuperación resultando 102,33; 100,40; 103,05 y 98,63%. En la Figura 18 se muestra una representación gráfica del análisis de recuperación donde se muestran los valores de concentración teórica de los niveles de fortificado en el eje de las abscisas, mientras que en el eje de las ordenadas se encuentran los valores de los porcentajes de recuperación correspondientes.

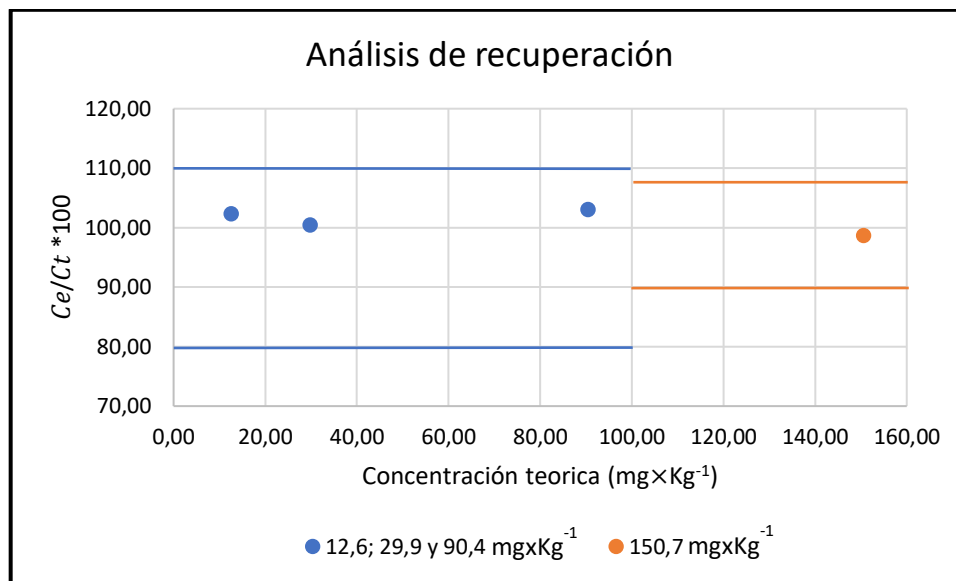


Figura 18. Gráfico del porcentaje de recuperación de los cuatro niveles de fortificado.

La Figura 18 muestra los valores de los porcentajes de recuperación obtenidos en los cuatro niveles de fortificado representados como un círculo de color azul para los niveles de fortificados de 12,6; 29,9 y 90,4 mg×Kg⁻¹, mientras que el nivel de fortificado de 150,7 mg×Kg⁻¹ se encuentra representado con un círculo de color naranja. Junto con ello se muestran los rangos de valores considerados como criterios de aceptación asociado al porcentaje de recuperación de cada nivel de concentración, representado con una línea continua de color celeste para los niveles de concentración inferiores a 100 mg×Kg⁻¹, mientras que los superiores a éste se representan con una línea continua de color naranja. Los resultados reportados en la Tabla 22 y en la Figura 18 aseguran que los valores del análisis de recuperación se encuentran dentro del rango criterio previamente establecido de acuerdo con la concentración fortificada.

3.1.6.2. Sesgo y error relativo

Se determinó el sesgo mediante la Ecuación 16 efectuando la diferencia absoluta entre las concentraciones medias experimentales de los cuatro niveles de fortificado y los valores de las concentraciones teóricas asociadas. A partir del sesgo se calculó el error relativo asociado a cada nivel de fortificado por medio de la Ecuación 17. En la Tabla 23 se muestran los valores de sesgo y porcentaje de error relativo por cada nivel de fortificado.

Tabla 23. Valores de sesgo y porcentaje de error relativo para los niveles de fortificado.

	Curva de rango bajo	Curva de rango alto		
Concentración teórica (mg×Kg ⁻¹)	12,6	29,9	90,4	150,7
Concentración media experimental (mg×Kg ⁻¹)	12,89	29,99	93,18	148,63
Sesgo	0,29	0,12	2,76	2,07
%Er	2,33	0,40	3,05	1,37

De acuerdo con los resultados reportados en la Tabla 23, los valores de la concentración media experimental reflejan una diferencia inferior a 3,05% en términos de error relativo con respecto al valor aceptado de la medida. Sin embargo, para evaluar el sesgo en términos de significancia se debe aplicar un test de t student para determinar si la diferencia entre los valores experimentales con respecto a los verdaderos es o no significativa (Sandoval, 2010). Para ello, se determinó el valor de t_{calc} en cada nivel de fortificado mediante la Ecuación 18, tal como se muestra en la Tabla 24. Mientras que el valor de t_{crit} se obtuvo de la tabla expuesta en el Anexo 14 considerando los grados de libertad ($n - 1$) equivalente a 4 y un valor de confianza de 95% con distribución de 2 colas.

Tabla 24. Valores de t calculado en los niveles de fortificado.

Nivel de fortificado ($\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$)	12,6	29,9	90,4	150,7
t_{calc}	1,32	0,55	1,92	2,76
t_{crit}	2,776			
Resumen	$t_{calc} < t_{crit}$			

En la Tabla 24 se observa que los valores t_{calc} de cada uno de los niveles de fortificado resultaron inferior al t_{crit} determinado por los grados de libertad y el nivel de confianza establecido. Por lo que no existen diferencias significativas entre la media de los valores experimentales y el valor considerado como aceptado, lo que indica que los errores sistemáticos del método son considerando como aceptables conduciendo a una buena veracidad.

3.1.7. Límites

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron estadísticamente en las curvas de calibrado promedio de rango bajo y alto. Para ello, se utilizó la recta de regresión convencional para la calibración de las curvas, donde se aplicó el supuesto fundamental del método de los mínimos cuadrados donde cada punto en la representación gráfica tiene una variación distribuida normalmente, por lo tanto, es apropiado utilizar el termino $S_{\frac{y}{x}}$ que corresponde a la desviación de la curva, para la estimación de los límites de detección y de cuantificación mediante la Ecuación 20. Así mismo, se determinó el valor del término S_0 que representa la desviación estándar del blanco mediante la Ecuación 19.

3.1.7.1. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Para la determinación de los límites de detección de las curvas promedio de rango bajo y alto, se obtuvo el producto entre el término S_0 y el factor de 3,28 mediante la Ecuación 21. En tanto que, para la determinación de los límites de cuantificación de ambas curvas, se obtuvo mediante el producto entre el término S_0 y el factor de 10 utilizando la Ecuación 22. En la Tabla 25 se muestran las concentraciones de benceno obtenidas en las curvas promedio que dan cuenta del límite de detección y cuantificación del método.

Tabla 25. Parámetros para la determinación de los límites de detección y cuantificación de la curva promedio de rango bajo y alto.

	$S_{\frac{y}{x}}$	S_0	LD (mg×Kg ⁻¹)	LC (mg×Kg ⁻¹)
Curva promedio de rango bajo	1162,15	0,01	0,03	0,11
Curva promedio de rango alto	9571,12	1,41	4,64	14,14

La Tabla 25 muestra que la medida cualitativa de benceno que puede ser confiablemente determinada por el método analítico de rango bajo y alto son 0,03 mg×Kg⁻¹ y 4,64 mg×Kg⁻¹ respectivamente. Mientras que la concentración mínima que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de exactitud y precisión para el rango bajo y alto son de 0,11 mg×Kg⁻¹ y 14,14 mg×Kg⁻¹ respectivamente.

3.1.8. Resumen de la validación del método

La validación del método fue efectuada de manera independiente tanto en el rango bajo como en el alto, evaluando los parámetros descritos anteriormente, linealidad, sensibilidad, selectividad, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación. La Tabla 26 muestra de manera resumida los valores obtenidos en los parámetros de validación considerados dentro de esta metodología.

Tabla 26. Tabla resumen con los valores de los parámetros asociados a las figuras de mérito evaluadas en la validación.

Figura de mérito	Parámetro Evaluado	Curva rango bajo	Curva rango alto				Valor criterio
Linealidad	r	1,00	0,999				$r > 0,99$
	r^2	1,00	0,999				$r^2 > 0,95$
	%RSD	0,90%	3,61%				%RSD < 5%
Sensibilidad	Pendiente (b)	$y = 87082,13x + 347,47$	$y = 5329,83x + 5759,14$				
Precisión (repetibilidad)	%CV _{repetibilidad}	Niveles de Fortificado (mg×Kg ⁻¹)				%CV _{Horwitz repetibilidad}	
		12,6	29,9	90,4	150,7		
		3,85 < 5,46	1,58 < 4,80	3,44 < 4,06	1,12 < 3,76		
Precisión (reproducibilidad)	%CV _{reproducibilidad}	4,91 < 7,28	2,18 < 6,40	3,66 < 5,42	2,17 < 5,01	%CV _{Horwitz reproducibilidad}	
Exactitud	% Recuperación	102,33	100,40	103,05	98,63	90 – 110 %	
LD	mg×Kg ⁻¹ suelo seco	0,03	4,64				
LC	mg×Kg ⁻¹ suelo seco	0,11	14,14				

En la Tabla 26 se observa que ambas curvas fueron evaluadas exitosamente considerando que cada uno de los parámetros de la validación cumplen con el valor criterio de aceptación señalado. Conforme con esto, el método analítico cumplió con el parámetro de linealidad ($r^2 > 0,999$), precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad ($\%CV_{Experimentales} < \%CV_{Máximo\ permitido\ por\ Horwitz}$), y exactitud (rango de $\% Recuperación$ entre 98,63 y 103,05%). El valor del límite de detección del método (LD) alcanzó un valor equivalente a $0,03\text{ mg}\times\text{Kg}^{-1}$ y un límite de cuantificación (LC) de $0,11\text{ mg}\times\text{Kg}^{-1}$ de benceno en suelo seco.

3.2. Biorremediación

Con el propósito de monitorear la cinética de biorremediación se aplicó la metodología validada para la determinación de las concentraciones de benceno remanente en los microcosmos de suelo utilizados en el proceso de biorremediación. Las concentraciones fueron determinadas mediante interpolación de la señal dada por el sistema HS-GC-FID en la curva de promedio escogiendo de rango bajo o alto dependiendo de la atenuación que se utilizó para medir las muestras. Para determinar la concentración de benceno en las muestras se consideró la señal promedio de las muestras por triplicado de cada condición y tiempo de muestreo.

La capacidad de la bacteria *C. metallidurans* MSR33 para biorremediar benceno fue evaluada en presencia y ausencia de Hg (II). Para ello, se utilizó una estrategia de bioaumentación de la cepa bacteriana con una población inicial de $1 \times 10^8\text{ UFC}\times\text{g}^{-1}$ en microcosmos de suelo seco.

3.2.1. Cinética de biorremediación

La cuantificación de benceno remanente en el proceso de biorremediación mediante la metodología validada permitió determinar la cinética de biorremediación de benceno ilustrada en la Figura 19.

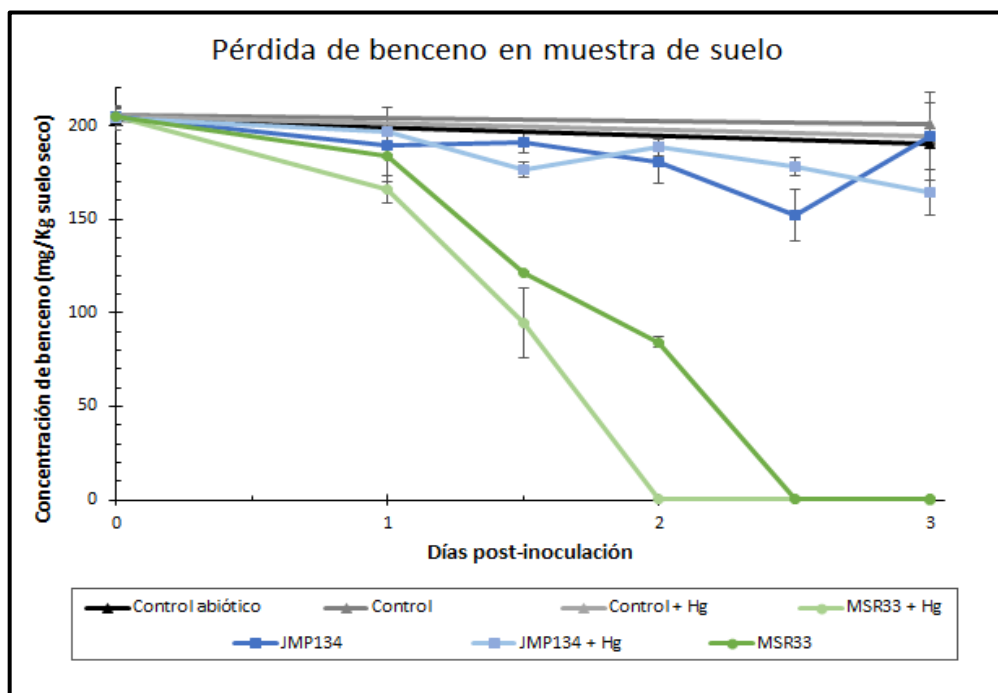


Figura 19. Cinética de pérdida de benceno en microcosmos de suelo a través de bioaumentación con cultivos de *C. metallidurans* MSR33.

La Figura 19 muestra la cinética de pérdida de benceno durante el proceso de biorremediación. Se comprobó que la bacteria bajo estudio *C. metallidurans* MSR33 es capaz de degradar benceno en suelo en presencia y ausencia de Hg (II). Donde la remoción más rápida de benceno ocurre cuando la bacteria está en presencia de mercurio, que en ausencia del mismo, dado que al cabo de las 48 h post-inoculación la cepa MSR33 remedió $199,5 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de benceno en un suelo contaminado además con $2 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de Hg (II) en suelo seco, mientras que en un suelo únicamente contaminado con benceno se registró una

remediación de benceno de $115,75 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ por parte de la cepa MSR33 en este mismo punto de muestreo. Por otra parte, la cepa *C. pinatubonensis* JMP134 no fue capaz de remediar benceno en ninguna de las condiciones aplicadas, se observa una reducción máxima entre $23,36$ y $47,96 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en la concentración de benceno en presencia de mercurio y en ausencia del mismo respectivamente, lo cual difiere significativamente de los controles.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Desafíos demandados por el proceso de biorremediación

Se validó una metodología para cuantificar el benceno remanente dentro del proceso de biorremediación bacteriana, y de esta forma efectuar su monitoreo dentro de una cinética de biorremediación bacteriana.

4.1.1. Determinación de benceno en una matriz compleja como el suelo

Uno de estos desafíos implicó el desarrollo de un método para determinar benceno en una matriz de importante complejidad como lo es el suelo. Es por ello, que la preparación de muestras empleadas en las curvas de calibrado se simplificó de gran manera con respecto a otras metodologías reportadas (Kiang & Grob, 1986; Ezquerro y col., 2004; Pérez y col., 2009; Styarini y col., 2011), dado que en este caso se realizó una dilución *in-situ* del analito considerando la masa de suelo seco, por lo que no se justificaba el hecho de realizar múltiples diluciones a partir de la solución estándar de benceno, sino más bien, se procedió a añadir distintos volúmenes de solución estándar a una misma masa de suelo seco, por lo que las concentraciones se determinaron considerando los miligramos de benceno en el volumen de solución añadido a la masa de suelo seco en términos de kilogramos. De esta forma, se disminuyó el error inherente que se encuentra implícito en el proceso de dilución empleado en la mayoría de las metodologías, dado que existe un error asociado a dicho proceso que conduce a una baja exactitud en las mediciones de ciertos métodos (Miller & Miller, 2002). Así mismo, la mayoría de las metodologías utilizan volúmenes de solventes orgánicos tóxicos para efectuar la dilución del analito (Zhao & Zhai, 2010; Balseiro-

Romero y col., 2016; Gallego-Díez y col., 2016), mientras que el sistema de dilución “*in situ*” desarrollado en esta metodología, sin la adición de solventes orgánicos, redujo los volúmenes de residuos líquidos producidos habitualmente en la construcción de curvas de calibrado generando una mínima cantidad de residuos tóxicos, estableciéndose como una metodología más amigable con el medioambiente.

La reducción de estos reactivos tóxicos en esta metodología evitó la interferencia que estos ejercen en la capacidad metabólica de la bacteria. Así mismo, se maximizó la sensibilidad del método mediante la eliminación de compuestos orgánicos adicionales como el metanol o acetona, donde en estado gaseoso compiten por el volumen disponible en el espacio de cabeza del vial de HS en donde se encontraba la muestra, provocando una disminución de la señal del analito (Kiang & Grob, 1986; Restek, 2003; Kolb & Etre, 2006). En la presente metodología, la señal observada se debió exclusivamente a la producida por el benceno, ya que este no se encuentra compitiendo con otros compuestos volátiles dentro del sistema. Así mismo, la metodología desarrollada presenta una alta selectividad, ya que en los cromatogramas del blanco no se muestra ningún tipo de señal en el tiempo del análisis y la única señal observada se debió al volumen de solución estándar de benceno adicionado al suelo. De igual manera, se disminuyó el costo del análisis, ya que el solvente utilizado fue agua miliQ, eliminando la adición de solventes orgánicos que finalmente son difíciles de disponer y caros de tratar. Por último, el tiempo de preparación de la muestra también se ve disminuido, ya que la adición de algún solvente orgánico usualmente implica la posterior evaporación del solvente con el fin de evitar que este interfiera en el análisis (Shin & Kwon, 2000).

4.1.2. No se utilizó estándar interno (IS)

La mayoría de las metodologías para determinar compuestos orgánicos volátiles por cromatografía gaseosa están sujetas a la utilización de estándar interno. Una de ellas corresponde al método 5021 establecido por la USEPA que describe la determinación de compuestos orgánicos volátiles (COV) en suelos y otras matrices sólidas utilizando análisis de equilibrio en el espacio de cabeza (HS) acoplado a un cromatógrafo de gases (GC) o un cromatógrafo de gases asociado a espectrometría de masas (GC-MS), donde se sugiere la selección de algún estándar interno disuelto en metanol (Drozd y col., 1990; Shin & Kwon, 2000; Varona-Torres y col., 2018). Sin embargo, en la presente investigación no se utilizó estándar interno al preparar las muestras dado que se trabajó bajo la premisa de efectuar la mínima perturbación de los microcosmos luego de ser fortificados con benceno para constituir un sistema cerrado con la menor manipulación e intervención posible. De esta forma, se eliminó la necesidad de abrir el microcosmos o inyectar el estándar interno por medio de la septa del vial previo a su análisis, evitando la pérdida del analito por manipulación de las muestras de microcosmos y con esto el sesgo generado por la introducción de errores sistemáticos (Miller & Miller, 2002).

4.2. Temperatura en la preparación de muestras

La preparación de muestras se efectuó utilizando una temperatura de trabajo inferior a la ambiental, dado que a temperatura ambiente se perdía parte importante del benceno en fase gas, introduciendo errores aleatorios al método que perjudicaban tanto a la precisión como la sensibilidad del método, dado que las señales obtenidas eran considerablemente menores a las verdaderas producto de la volatilización. En consecuencia, tanto para el

desarrollo de las curvas de calibrado en suelo, como para la preparación de muestras involucrada en el proceso de biorremediación se trabajó con una caja de hielo que permitió mantener en todo momento la solución de benceno a baja temperatura (Figura 12). Al mismo tiempo, el lugar donde se encontraban las muestras para su posterior análisis se encontraba suministrado con aire acondicionado a 16 °C lo que impidió la volatilización de benceno en las muestras de vial que se encontraban en el HS esperando ser analizadas.

4.3. Tiempo de análisis

El tiempo involucrado en el análisis de un método es fundamental para evaluar la eficiencia frente a otras metodologías utilizadas. En este caso, el método desarrollado implicó un tiempo de análisis equivalente a 22,7 minutos, considerablemente menor al reportado por otros autores (Shin & Kwon, 2000; Margesin y col., 2003) quienes emplearon una metodología que requiere un mayor tiempo de análisis, de modo que las condiciones experimentales del presente método representan una mejora notable con respecto al tiempo de análisis frente a otras metodologías.

La técnica de extracción empleada en esta metodología utilizando el headspace como una técnica de extracción totalmente automatizada, aportó en gran parte con la rapidez, sensibilidad y facilidad en el análisis. Por la misma razón, esta técnica de extracción es ampliamente utilizada en diversas investigaciones donde se determina benceno en muestras de agua y suelo (Margesin y col., 2003; Kolb & Etre, 2006; Rosas y col., 2010) evitando el procedimiento de la preparación de muestras que muchas veces se encuentra asociado a un alto costo y tiempo dentro del análisis, al utilizar disolventes orgánicos

como lo hacen otras técnicas de extracción de contaminantes orgánicos (Restek, 2003; Balseiro-Romero y col., 2016).

El conjunto de estas características conforma un método ideal para el análisis de una gran cantidad de muestras en poco tiempo, manteniendo la sensibilidad, exactitud y precisión requerida para la investigación satisfaciendo además los desafíos demandados para el uso previsto.

4.4. Validación del método

La metodología desarrollada y posteriormente validada para la cuantificación de benceno en los microcosmos permitió obtener resultados exactos, precisos, repetibles y reproducibles (Tabla 26). Cada uno de los parámetros se comparó con los informados por metodologías ya validadas presentando ventajas prácticas frente a los métodos de referencia.

4.4.1. Linealidad

La linealidad como figura de mérito constituye un elemento fundamental en la validación del método, dado que a partir de ella se logró abarcar un rango de intervalo de trabajo mayor al considerar dos atenuaciones diferentes en la señal. De esta manera, al separar en rango bajo y alto, se logró obtener una alta linealidad dentro de los intervalos dados, donde la evaluación de este parámetro analítico se realizó en función principalmente del coeficiente de determinación (r^2) y %RSD obtenido en las curvas de calibrado de rango bajo y alto (Tabla 9 y 10). Así mismo, se cumplió con los criterios de aceptación previamente establecidos en la validación del método, donde se exigió un valor de r^2 superior a 0,95 y un %RSD de los factores respuesta menor al 5% (USEPA, 1996; Suarez

y col., 2009). Incluso algunos valores de r^2 alcanzaron un valor equivalente a 1,00 señalando que existe un buen ajuste lineal entre la concentración del analito y la señal asociada, parámetros incluso superiores a los reportados por tecnologías más modernas, de mayor complejidad y a un costo significativamente superior (Martines y col., 1996; Zhao & Zhai, 2010; Balseiro-Romero & Monterroso 2013; Balseiro-Romero y col., 2016).

4.4.2. Intervalo de trabajo

El rango de concentración utilizando las dos curvas de calibrado (rango bajo y rango alto), abarcó un rango de concentración equivalente entre 0,2 a 200 $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$ de benceno en suelo seco, lo que equivale a una diferencia de 1000 veces entre el límite de concentración inferior y el superior, cubriendo de sobra los requerimientos para lo cual esta metodología fue desarrollada. Las metodologías reportadas donde se determina benceno en suelo abarcan un rango de trabajo mucho menor al desarrollado en la presente investigación (Zhao & Zhai, 2010; Cao y col., 2013). Por tanto, la aplicación de esta metodología permite obtener un seguimiento del benceno en suelo dentro de un rango superior con respecto a las ya reportadas.

4.4.3. Precisión

4.4.3.1. Precisión en curvas de calibrado

Se evaluó la precisión de las curvas de calibrado construidas en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. Para ello, se consideró la repetibilidad de manera independiente en cada una de las tres curvas de calibrado de ambos rangos. Los valores obtenidos del coeficiente de variación de los datos en cada nivel de concentración indicaron que el grado de dispersión de los valores en condiciones de repetibilidad se

encontraban conforme con el criterio de aceptación informado por Horwitz (Tabla 12 y 13). Así mismo, se evaluó este parámetro estadístico, pero en condiciones de reproducibilidad, donde se consideraron los valores de los niveles de concentración obtenidos en distintos días. Los valores de coeficiente de variación de estos datos resultaron inferiores a los indicados por Horwitz (Tabla 14 y 15). De esta manera se demostró la existencia de la precisión en las curvas de calibrado de rango bajo y alto.

Así mismo, la precisión en las curvas fue evaluada mediante los índices de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en los niveles de concentración de las curvas de calibrado. La diferencia entre los valores individuales obtenidos en condiciones de reproducibilidad en las curvas de rango bajo y alto cumplieron con los respectivos índices de reproducibilidad (Anexo 10). En tanto que, la diferencia entre los niveles de concentración obtenidos en condiciones de repetibilidad superó los índices establecidos tanto en la curva de rango bajo como en la de rango alto (Tabla 16). Sin embargo, se comprobó estadísticamente mediante un test de Fisher que no existe diferencia significativa entre las curvas de calibración involucradas (Tabla 19). Demostrando que tanto la variación dentro del día, como la variación a largo plazo, expresa niveles aceptables dentro de las curvas de calibrado (Boqué y col., 2002).

4.4.3.2. Precisión del método

La precisión del método analítico se evaluó en términos de repetibilidad y reproducibilidad por medio del coeficiente de variación de las muestras de fortificado construidas bajo ambas condiciones. La repetibilidad del método se determinó en el rango bajo y alto de la curva, donde todos los coeficientes de variación obtenidos se encontraron

siempre dentro de los valores aceptados por Horwitz en condiciones de repetibilidad (Tabla 20). De igual manera, la reproducibilidad fue evaluada por medio del coeficiente de variación en los fortificados preparados en distintos días, obteniendo siempre valores dentro del criterio de aceptación interpuesto por Horwitz en condiciones de reproducibilidad (Tabla 21). Por lo tanto, se evaluó de manera exitosa la precisión del método, demostrando que los datos cumplen con una dispersión aceptable entre los resultados obtenidos con respecto al promedio.

4.4.4. Exactitud

Como parte de la exactitud del método se evaluó la veracidad por medio de las muestras fortificadas a distintas concentraciones, con el propósito de reemplazar un material de referencia certificado con el que no se disponía. Este parámetro se determinó en todo el intervalo de trabajo mediante el porcentaje de recuperación aparente y se comparó con el criterio de aceptación previamente establecido (Tabla 22). Los resultados demuestran que existe exactitud dentro de todo el intervalo de trabajo dado que los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran dentro del criterio de aceptación. Así mismo, se evaluó el sesgo mediante el test de t student aplicado en los cuatro niveles de fortificado, donde todos los casos se cumplieron que el $t_{calc} < t_{crit}$ (Tabla 24), indicado que el sesgo obtenido para el presente método es apropiado, y por tanto presenta una veracidad aceptable. Por lo que se puede concluir que los resultados obtenidos por medio de la presente metodología se encuentran cercanos al valor verdadero, indicando una baja recurrencia de errores sistemáticos.

4.4.5. Límites de detección y de cuantificación

El límite de detección obtenido por este método equivalente a $0,03 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de benceno en suelo, resultó ser un valor muy cercano al valor reportado por laboratorios de servicios como el laboratorio de aguas y riles de la Dirección de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile (DICTUC) equivalente a $0,01 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ suelo seco.

Diversas investigaciones han reportado alcanzar límites de detección y cuantificación inferiores a los reportados en el presente método (Styarini y col., 2011; Balseiro-Romero y col., 2016). Sin embargo, en estas metodologías se utilizan equipos con una gran capacidad de resolución que se encuentran asociados a un alto costo de funcionamiento y mantención, donde, en la mayoría de los casos se requiere además de personal calificado con una experiencia superior con respecto a la manipulación del sistema. Así mismo, este método se estableció con el fin de monitorear la cinética de biorremediación de benceno empleando la bacteria MSR33 hasta alcanzar una concentración tal, que se considere el suelo como libre de contaminación. Para ello, se comparó con la normativa de referencia internacional de Estados Unidos, la cual señala que un suelo de uso agrícola no debe sobrepasar el valor umbral equivalente a $0,07 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de benceno en suelo (MMA, 2012). De esta manera, la metodología desarrollada presenta un límite de detección inferior a la concentración de benceno exigida por la normativa de referencia y otras menos estrictas como la norma mexicana que exige $6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ como límite máximo permisible para benceno en un suelo agrícola (NOM-138-SERMARNAT/SS-2003). En consecuencia, la metodología permitió monitorear el tiempo exacto en que la remediación

biológica alcanzó las concentraciones de benceno indicadas en las normas de referencia, donde se considera el suelo como descontaminado por debajo de los $0,07 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de benceno en suelo seco.

En síntesis, en la Tabla 27 se señalan las ventajas prácticas que presenta la metodología desarrollada frente a otras utilizadas en metodologías reportadas y utilizadas para determinar benceno, entre otros compuestos volátiles utilizando un sistema GC-FID.

Tabla 27. Ventajas prácticas del método analítico desarrollado frente a otros reportados.

Parámetros	Presente trabajo	Método 5021 USEPA	Gallego-Diéz	Ventajas analíticas
Solventes orgánicos	Agua	Metanol	Acetona y Metanol	<ul style="list-style-type: none"> Menor generación de residuos tóxicos Menor costo de reactivos Mayor sensibilidad
Estándar interno (IS)	Ninguno	Fluorbenceno	Fluorbenceno	<ul style="list-style-type: none"> Menor perturbación al sistema
Preparación del estándar	Dilución "in situ"	Dilución seriada	Dilución seriada	<ul style="list-style-type: none"> Menor error por introducción de material volumétrico
LOD y LOQ	0,03 y 0,11 $\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$	0,1 a 3,4 $\mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$	0,047 y 0,279 $\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> Determina valores inferiores a los exigidos por la normativa
%RSD	< 4,56%	< 5%	9,78%	<ul style="list-style-type: none"> Menor error aleatorio
Tiempo de análisis (min)	22,7	40 aprox.	25 aprox.	<ul style="list-style-type: none"> Menor tiempo de análisis

4.5. Aplicación del método validado en un proceso de biorremediación bacteriana

La metodología validada fue aplicada con éxito dentro del proceso de biorremediación bacteriana, donde fue empleado en los 5 tiempos de muestreo. Gracias a la aplicación de esta metodología se logró comprobar que la bacteria *C. metallidurans* MSR33 tiene la capacidad de degradar benceno en suelo tanto en presencia de mercurio como en ausencia del mismo. En el monitoreo de la cinética de biorremediación utilizando la cepa MSR33 en un suelo contaminado con mercurio empleando la metodología validada para su posterior cuantificación, reflejó las desviaciones estándar equivalente a 7,55; 18,86; 0,03; 0,006 mg×Kg⁻¹ de benceno en suelo, para las horas 24, 36, 48, 60 y 72 respectivamente, otorgando fiabilidad y veracidad en los resultados.

V. PROYECCIONES

El desarrollo de la presente investigación establece un plano de estudio dirigido hacia la innovación sobre procesos de descontaminación que sean costo efectivo y al mismo tiempo amigables con el medio ambiente. Resulta sugestivo continuar con la investigación desde la implementación a una situación real de contaminación de suelos con benceno u otros contaminantes orgánicos, junto con metales pesados, como los sitios emplazados alrededor de actividades antropogénicas donde existen diversas fuentes de contaminantes, tales como, las termoeléctricas o yacimientos mineros. Así mismo, la validación de la presente metodología pretende establecer una base para desarrollar, optimizar y validar nuevas metodologías que se encuentren limitadas por un fin específico previsto, como ocurrió en esta investigación, donde la metodología para la cuantificación de benceno enmarcado dentro de un proceso de biorremediación bacteriano demandaba una serie de nuevas medidas prácticas.

VI. CONCLUSIONES

- La metodología validada para la determinación del benceno remanente tras la aplicación del proceso de biorremediación cumplió con los criterios analíticos establecidos previamente.
- La evaluación de los parámetros analíticos como la linealidad, selectividad, sensibilidad, exactitud, veracidad y precisión proporcionó la información adecuada sobre el cumplimiento de las especificaciones establecidas para cada parámetro.
- La metodología analítica validada en este trabajo permitió determinar la cinética de biorremediación de benceno utilizando *C. metallidurans* MSR33, demostrando que es más rápida en presencia de mercurio que en ausencia del mismo.
- El método desarrollado permite detectar concentraciones de benceno en suelo acorde a las exigidas en las regulaciones internacionales, tales como, las establecidas en Estados Unidos $0,07 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ y México $6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$.
- La metodología desarrollada y posteriormente validada garantizó confiabilidad, veracidad y reproducibilidad en los resultados obtenidos en la determinación de benceno en el proceso de biorremediación bacteriana.
- La bacteria *C. metallidurans* MSR33 tiene la capacidad de degradar benceno en sitios co-contaminados con benceno y mercurio.
- Este estudio aporta a desarrollar nuevas estrategias de metodologías para la determinación de contaminantes y el seguimiento de su remoción en el proceso de

biorremediación de suelos con contaminación mixta por compuestos aromáticos y metales pesados tales como sitios industriales, mineros y agrícolas.

VII. REFERENCIAS

Ali, H., Khan, E., & Anwar, M. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869–881. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075

Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals in Soils. Soil Research Centre, Department of Geography and Environmental Science, School of Human and Environmental Sciences, University of Reading, Whiteknights, Reading, UK. (pp.18-30).

AEFI, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (2001). Validación de métodos analíticos. (pp.23-113).

Balseiro-Romero, M., & Monterroso, C. (2013). A Headspace-Analysis Approach to Assess the Sorption of Fuel Volatile Compounds by Soils. *Soil Science Society of America Journal*, *77*, 800-808. doi.org/10.2136/sssaj2012.0245

Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., & Chaves-Padín, R. (2016). Development and optimization of headspace and headspace-solid phase microextraction for the determination of volatile fuel compounds in environmental samples. *Spanish Journal Of Soil Science*, *6*(3), 230–243. doi.org/10.3232/SJSS.2016.V6.N3.05

Boqué, B. R., Maroto, A., Riu, J., & Rius, F. X. (2002). Validation of Analytical Methods. *Grasas y aceites*, *53*, 128–143.

Burbano-Orjuela. H. (2016). The soil and its relationship with ecosystem services and food security. *Rev. Cienc. Agr.*, *33*(2), 117-124. doi.org/10.22267/rcia.163302.58

Cachada, A., Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2018). Soil and Pollution: An Introduction to the Main Issues. *Soil Pollution*, 1-28. doi.org/10.1016/B978-0-12-849873-6.00001-7

Cao, L., Jiang, H., Yang, J., Fan, L., Li, F., & Huang, Q. (2013). Simultaneous Determination of Benzene and Toluene in Pesticide Emulsifiable Concentrate by Headspace GC-MS. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2013*, 1–5. doi.org/10.1155/2013/121783

Carberry, J., & Wilk, J. (2001). Comparison of Ex situ and In situ Bioremediation of Unsaturated Soils Contaminated by Petroleum. *J. Environ. Sci. Health, A36*(8), 1491-1503. doi.org/10.1081/ESE-100105726

CENMA, Centro Nacional del Medio Ambiente. (2014). Diagnostico Regional de Suelos Abandonados con Potencial Presencia de Contaminantes. Recuperado el 10 de octubre de 2018. Obtenido de www.cenma.cl

CIREN, Centro de Información de Recursos Naturales. (2010). Determinación de Erosión Potencial y Actual de Chile. Recuperado el 25 de octubre 2018. Obtenido de www.bibliotecadigital.ciren.cl

Colombo, M., Cavalca, L., Bernasconi, S., & Andreoni, V. (2011). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenicum* strain C3R: A feasibility study in solid- and slurry-phase microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation, 65*(1), 191–197. doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.002

Conde, G. (2015). Contaminación de los Suelos y Aguas Subterráneas. Máster en Ingeniería y Gestión Medioambiental. Recuperado 28 de junio 2018. Obtenido de www.eoi.es/es/savia/

Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., & Peña Cabriales, J.J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria, 25*(3), 40-45. doi.org/10.15174/au.2015.907

Dados, A., Omirou, M., Demetriou, K., Papastephanou, C., & Ioannides, I. M. (2015). Rapid remediation of soil heavily contaminated with hydrocarbons: a comparison of different approaches. *Annals of Microbiology, 65*(1), 241–251. doi.org/10.1007/s13213-014-0856-5

Dean, B.J. (1985). Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research, 154*, 153-181.

Directive E.C. (2008). 105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC. *Official Journal of the European Union, 348*, 84-97.

Drozd, J., Vodakova, Z., & Koupil, P. (1990). Systematic errors with the use of internal standard calibration in gas chromatographic headspace analysis. *Journal of Chromatography*, *518*, 1–8.

Dua, M. M. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology Biotechnology*, *59*(2-3), 143–152. doi.org/10.1007/s00253-002-1024-6

Eurachem. (2005). La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Recuperado el 20 de mayo 2018. Obtenido de www.eurachem.org

Ezquerro, Ó., Ortiz, G., Pons, B., & Tena, M. T. (2004). Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, *1035*(1), 17–22. doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.030

Galán, E. H., & Romero, A. B. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Rev. De la sociedad española de mineralogía*, *10*, 48-60.

Gallego-Diez, M. L., Correa-Ochoa, M. A., & Saldarriaga-Molina, J. C. (2016). Validation of a methodology to determine Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes concentration present in the air and adsorbed in activated charcoal passive samplers by GC/FID chromatography. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, *79*, 138-149. doi.org/10.17533/udea.redin.n79a13

Gevao, B., Semple, K. T., & Jones, K. C. (2000). Bond pesticides residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, *108*(1), 3-14.

Gonzáles, S., & Bergqvist, E. (1986). Evidencias de Contaminación con Metales Pesados en un Sector de Secano Costeros de la V Región. *Agricultura Técnica (Chile)*, *46*(3), 299-306.

Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation - Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, *170*, 10–16. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.165

Guiwei, Q., de Varennes, A., & Cunha-Queda, C. (2008). Remediation of a mine soil with insoluble polyacrylate polymers enhances soil quality and plant growth. *Soil Use and Management*, 24(4), 350–356. doi.org/10.1111/j.1475-2743.2008.00173.x

Hu, X., Zhang, Y., Luo, J., Wang, T., Lian, H., & Ding, Z. (2011). Bioaccessibility and health risk of arsenic, mercury and other metals in urban street dusts from a mega-city, Nanjing, China. *Environmental Pollution*, 159(5), 1215-1221. doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.037

IAP, Instituto de Asuntos Públicos. (2016). Informe País: Estado del Medio Ambiente en Chile, comparación 1999-2015. Recuperado el 14 de mayo 2018. Obtenido de www.uchile.cl/publicaciones

ICH, International Conference on Harmonization. (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. European Medicines Agency. Recuperado el 21 de abril 2018. Obtenido de www.ema.europa.eu

ISO 5725, International Organization for Standardization. (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Recuperado el 15 de abril 2018. Obtenido de www.iso.org

ISO 11843-1, International Organization for Standardization. (1997). Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. Recuperado el 15 de abril 2018. Obtenido de www.iso.org

ISO 8402, International Organization for Standardization. (1995). Gestión de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario. Recuperado el 15 de abril 2018. Obtenido de www.iso.org

Iturbe, R., & López, J. (2015). Bioremediation for a Soil Contaminated with Hydrocarbons. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 6(2), 1-6. doi.org/10.4172/2157-7463.1000208

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167–182. doi.org/10.1093/bmb/ldg032

Kiang, P. H., & Grob, R. L. (1986). A headspace technique for the determination of volatile compounds in soil. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering*, 21(1), 71-100. doi.org/10.1080/10934528609375276

Kolb, B., & Ettre, L. S. (2006). *Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice*. (pp.166-177)

Kovalick, W. (1991). Perspectives on health and environmental risks of soil pollution and experiences with innovative remediation technologies. Paper presented at the 4th World Congress on Chemical Engineering, Karlsruhe, Germany.

Lozada, M., Marcos, M. S., & Dionisi, H. M. (2012). La biorremediación de ambientes costeros contaminados con hidrocarburos. Secretaria de Cultura provincia del Chubut.

Margesin, R., Walder, G., & Schinner, F. (2003). Bioremediation Assessment of a BTEX-Contaminated Soil. *Acta Biotechnol*, 23(1), 29–36.

Martines, C., Longo, M., Lerda, D., Ceroni, G., & Cavalláro, A. (1996). A GC Method for the Quantitative Determination of BTEX in Gasoline. *Journal of Chromatographic Science*, 34, 413–417.

McAlpine, D., & Araki, S. (1958). Minamata Disease An Unusual Neurological Disorder Caused by Contaminated Fish. From the Department of Neuropsychiatry, the Medical School, Kumamoto University, Kyushu, Japan.

Mehlman, M. (1992). Dangerous and Cancer-Causing Properties of Products and Chemicals in the Oil Refining and Petrochemical Industry. *Environmental Research* 59, 238-249.

Mergler, D., Anderson, H. A., Laurie, H., Kathryn, R., Murray, M., Sakamoto, M., & Stern, A. (2007). Methylmercury Exposure and Health Effects in Human: A Worldwide Concern. *Royal Swedish Academy of Science*, 36(1), 3–11.

Millacura, F. A., Cárdenas, F., Mendez, V., Seeger, M., & Rojas, L. A. (2017). Degradation of benzene by the heavy-metal resistant bacterium *Cupriavidus metallidurans* CH34 reveals its catabolic potential for aromatic compounds. *bioRxiv*, 1-30. doi.org/10.1101/164517

Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Pearson Educación. S.A. (pp.111-151)

MMA, Ministerio del Medio Ambiente. (2012). Guía Metodológica para la gestión de suelos con potencial presencia de contaminantes. Recuperado el 20 de junio 2018. Obtenido de www.cenma.cl

MMA, Ministerio del Medio Ambiente. (2016). Informe del Estado del Medio Ambiente. Recuperado el 17 de agosto 2017. Obtenido de portal.mma.gob.cl

Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., & Mergeay, M. (2007). Plasmids pMOL28 and mMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7417-7425. doi.org/10.1128/JB.00375-07

Morgan, H., Jeffries, J., Waterfall, E., & Earl, N. (2009). Soil Guideline Values for benzene in soil. Science Report SC050021/benzene SGV.

NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. (2005). Norma Oficial Mexicana, Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y Las Especificaciones para su Caracterización y Remediación.

Oehmen, A., Vergel, D., Fradinho, J., Reis, M. A. M., Crespo, J. G., & Velizarov, S. (2014). Mercury removal from water streams through the ion exchange membrane bioreactor concept. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 65–70. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.067

OCDE, Organización para la Cooperación y el Desarrollo. (2016). Evaluación del desempeño ambiental: Chile 2016.

Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V., & Toro, L. (2004). Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: pollution detection and affinity series. *Environmental Pollution*, 132(2), 189–201. doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.002

Peckham, T., Kopstein, M., Klein, J., & Dahlgren, J. (2012). Benzene-contaminated toluene and acute myeloid leukemia: a case series and review of literature. *Toxicology and Industrial Health*, 30(1), 73-81. doi.org/10.1177/0748233712451764

Pérez, J. L., Herrero, S., García, C., & Moreno, B. (2009). Programmed temperature vaporizer based method for the sensitive determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils. *Journal of Chromatography A*, 1216(32), 6063-6070. doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.057

Polo, A., Hernández, D., & Fritis, H. (2002). Introducción: Contaminación y restauración de suelos. *Ciencia y Medio Ambiente - CCMA-CSIC*, 105-114.

Prenafeta-Boldú, F. X., Ballerstedt, H., Gerritse, J., & Grotenhuis, J. T. C. (2004). Bioremediation of BTEX hydrocarbons: Effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. *Biodegradation*, 15, 59-65.

Restek, (2003). A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC. Recuperado 25 de mayo 2018. Obtenido de www.restek.com

Rojas, L.A., Yañez, C., Gonzalez, M., Lobos, S., Smalla, K., & Seeger, M. (2011). Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS ONE*, 6(3), e17555. doi.org/10.1371/journal.pone.0017555

Rosas, M., Domingues, V., Marco, P. De, Oliva-teles, T., Fiuza, A., Albergaria, J. T., & Delerue-matos, C. M. (2010). Bioremediation of humic soils contaminated with benzene. *Environmental Biotechnology* 6(1), 11-15.

Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Instituto de Salud Pública.

Sandrin, T. R., Chech, A. M., & Maier, R. M. (2000). A Rhamnolipid Biosurfactant Reduces Cadmium Toxicity during Naphthalene Biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4585-4588. doi.org/10.1128/AEM.66.10.4585-4588.2000

Semple, K. T., Reid, B. J., & Fermor, T. R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environment Pollution*, 112(2), 269-283.

Sherameti, I., & Varma, A. (2015). Heavy Metal Contamination of Soils: Monitoring and Remediation. *Soil Biology*. (pp.16-32). doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6

Shin, H.S., & Kwon, O. S. (2000). The simultaneous analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, o, m, p-xylenes and total petroleum hydrocarbons in soil by GC-FID after ultra-sonication. *Bulletin-Korean Chemical Society*, 21(11), 1100 -1105.

Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodriguez-Calvo, A., Gonzales-López, J., & Calvo, C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environmental Research* 137, 49-58. doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.009

Smalla, K., Heuer, H., Gotz, A., Niemeyer, D., Krogerrecklenfort, E., & Tietze, E. (2000). Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4854-4862. doi.org/10.1128/AEM.66.11.4854-4862.2000

Song, B., Zeng, G., Gong, J., Liang, J., Xu, P., Liu, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Cheng, M., Liu, Y., Ye, S., Yi, H., & Ren, X. (2017). Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. *Environment International*, 105(2017), 43–55. doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.001

Styarini, D., Zuas, O., & Hamim, N. (2011). Validation and Uncertainty Estimation of Analytical Method for Determination of Benzene in Beverages. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 6(3), 159–172.

Su, C., Jiang, L., & Zhang, W. (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics*, 3(2), 24–38.

Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F., & Hernández, G. (2009). Validación de un método para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química*, 4(2), 53-62.

Towhid, K. (2013). Soils: Principles, Properties and Management. Department of Soil Science, University of Chittagong. doi.org/10.1007/978-94-007-5663-2

USEPA, United States Environmental Protection Agency. (1996). Method 5021: Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis. Recuperado 20 de mayo 2018. Obtenido de www.caslab.com

USEPA, United States Environmental Protection Agency. (2007). Treatment technologies for site cleanup: Annual Status Report. Recuperado el 18 de Julio 2018. Obtenido de www.epa.gov

Van Der Perk, M. (2014). Soil and water contamination. 2nd Edition. Organic Pollutants. (pp. 75-90).

Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., & Louwagie, G. (2014). Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe. JRC Reference Reports. (pp.36). doi.org/10.2788/4658

Varona-torres, E., Carlton, D. D., Hildenbrand, Z. L., & Kevin, A. (2018). Matrix-effect-free determination of BTEX in variable soil compositions using room temperature ionic liquid co-solvents in static headspace gas chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1021, 41-50. doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.017

Velimirovic, M., Tosco, T., Uyttebroek, M., & Luna, M. (2014). Field assessment of guar gum stabilized microscale zerovalent iron particles for in-situ remediation of 1, 1, 1-trichloroethane. *Journal of Contaminant Hydrology*, 164, 88-99. doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.05.009

VIM, International Vocabulary of Metrology. (2006). Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM). 3rd edition Final draft.

Volke, T., Velasco, A., & De la Rosa, A. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología.

Weast, R. C. (1984). *CRC Handbook of chemistry and physics* (64 Edition).










Wood, J. M. (1974). Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science*, 183, 1049-1052.

Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology, 2011*, 1-20. doi.org/10.5402/2011/402647

Zhao, S., & Zhai, A. (2010). Determination of Volatile Aromatic Compounds in Soil by Manual SPME and Agilent 5975T LTM GC/MSD. Recuperado el 28 de junio 2018. Obtenido de www.agilent.com

ANEXOS

ANEXO 1

BENCENO			ICSC: 0015 Mayo 2003
CAS: RTECS: NU: CE Índice Anexo I: CE / EINECS:	71-43-2 CY1400000 1114 601-020-00-8 200-753-7	Ciclohexatrieno Benzol C ₆ H ₆ Masa molecular: 78.1	 
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Altamente inflamable.	Evitar las llamas. NO producir chispas y NO fumar.	Polvo. AFFF. espuma. dióxido de carbono.
EXPLOSIÓN	Las mezclas vapor/aire son explosivas. Riesgo de incendio y explosión: véanse Peligros Químicos.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosión. NO utilizar aire comprimido para llenar, vaciar o manipular. Utilícense herramientas manuales no generadoras de chispas. Evitar la generación de cargas electrostáticas (por ejemplo, mediante conexión a tierra).	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
EXPOSICIÓN		¡EVITAR TODO CONTACTO!	
Inhalación	Vértigo. Somnolencia. Dolor de cabeza. Náuseas. Jadeo. Convulsiones. Pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	PUEDA ABSORBERSE! Piel seca. Enrojecimiento. Dolor. (Además, véase Inhalación).	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Pantalla facial, o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad). después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal. Dolor de garganta. Vómitos. (para mayor información, véase Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Eliminar toda fuente de ignición. Recoger, en la medida de lo posible, el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes herméticos. Absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. NO verterlo al alcantarillado. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente. (Protección personal adicional: traje de protección completa incluyendo equipo autónomo de respiración).		No transportar con alimentos y piensos. Clasificación UE Símbolo: F, T R: 45-46-11-36/38-48/23/24/25-65 S: 53-45 Nota: E Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: II	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-30S1114/30GF1-II Código NFPA: H 2; F 3; R 0;		A prueba de incendio. Separado de alimentos y piensos, oxidantes y halógenos.	
Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2005			
      			

BENCENO		ICSC: 0015
DATOS IMPORTANTES		
<p>ESTADO FÍSICO: ASPECTO Líquido incoloro, de olor característico.</p> <p>PELIGROS FÍSICOS El vapor es más denso que el aire y puede extenderse a ras del suelo; posible ignición en punto distante. Como resultado del flujo, agitación, etc., se pueden generar cargas electrostáticas.</p> <p>PELIGROS QUÍMICOS Reacciona violentamente con oxidantes, ácido nítrico, ácido sulfúrico y halógenos, originando peligro de incendio y explosión. Ataca plásticos y caucho.</p> <p>LÍMITES DE EXPOSICIÓN TLV: 0.5 ppm como TWA; 2.5 ppm como STEL; (piel): A1; BEI establecido (ACGIH 2004). MAK: H; Cancerígeno clase: 1; Mutágeno clase: 3A; (DFG 2004).</p>	<p>VÍAS DE EXPOSICIÓN La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión.</p> <p>RIESGO DE INHALACIÓN Por evaporación de esta sustancia a 20°C se puede alcanzar muy rápidamente una concentración nociva en el aire.</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN La sustancia irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio. La ingestión del líquido puede dar lugar a la aspiración del mismo por los pulmones y la consiguiente neumonitis química. La sustancia puede causar efectos en el sistema nervioso central, dando lugar a disminución de la consciencia. La exposición muy por encima del OEL puede producir pérdida del conocimiento y muerte.</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA El líquido desengrasa la piel. La sustancia puede afectar a la médula ósea y al sistema inmune, dando lugar a una disminución de células sanguíneas. Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos.</p>	
PROPIEDADES FÍSICAS		
<p>Punto de ebullición: 80°C Punto de fusión: 6°C Densidad relativa (agua = 1): 0.88 Solubilidad en agua, g/100 ml a 25°C: 0.18 Presión de vapor, kPa a 20°C: 10 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 2.7</p>	<p>Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.2 Punto de inflamación: -11°C c.c. Temperatura de autoignición: 498°C Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 1.2-8.0 Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 2.13</p>	
DATOS AMBIENTALES		
La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos.		
NOTAS		
El consumo de bebidas alcohólicas aumenta el efecto nocivo. Está indicado examen médico periódico dependiendo del grado de exposición. La alerta por el olor es insuficiente. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en octubre de 2004: ver Clasificación UE.		
INFORMACIÓN ADICIONAL		
<p>Límites de exposición profesional (INSHT 2011): VLA-ED: 1 ppm; 3.25 mg/m³</p> <p>C1A (Sustancia carcinogénica de categoría 1A). M1B (Sustancia mutagénica de categoría 1B).</p> <p>Notas: vía dérmica. Es de aplicación el RD 1124/2000, por el que se modifica el RD 665/1997 de agentes cancerígenos. Esta sustancia tiene establecidas restricciones a la fabricación, comercialización o al uso especificadas en el Reglamento REACH.</p> <p>VLB: 0,045 mg/g creatinina en orina de ácido S-Fenilmercaptúrico; 2 mg/L en orina de ácido t.t-Mucónico; 5 µg/L en sangre de benceno total.</p>		
NOTA LEGAL	Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.	
© IPCS, CE 2005		

ANEXO 2

Cálculo para la determinación del coeficiente de correlación (r) en todas las curvas de calibración de rango bajo y alto.

Tabla A1. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva 1 de calibración de rango bajo.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	0,2	17671,91	-6,41	-5,58E+05	41,09	3,12E+11	3,58E+06
	0,5	42370,16	-6,11	-5,34E+05	37,35	2,85E+11	3,26E+06
	2,5	209900,62	-4,12	-3,66E+05	16,95	1,34E+11	1,51E+06
	10	841423,19	3,25	2,65E+05	10,59	7,04E+10	8,63E+05
	20	1695795,22	13,39	1,12E+06	179,35	1,25E+12	1,50E+07
Prom	6,61	561432,22					
Sum					285,32	2,05E+12	2,42E+07
r	1,00						

Tabla A2. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva 2 de calibración de rango bajo.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	0,2	17486,59	-6,41	-5,59E+05	41,09	3,12E+11	3,58E+06
	0,5	43953,98	-6,11	-5,32E+05	37,35	2,83E+11	3,25E+06
	2,5	218636,40	-4,12	-3,57E+05	16,95	1,28E+11	1,47E+06
	10	856823,89	3,25	2,81E+05	10,59	7,88E+10	9,13E+05
	20	1741929,65	13,39	1,17E+06	179,35	1,36E+12	1,56E+07
Prom	6,61	575766,10					
Sum					285,32	2,16E+12	2,48E+07
r	1,00						

Tabla A3. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva 3 de calibración de rango bajo.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	0,2	18160,64	-6,41	-5,58E+05	41,09	3,11E+11	3,58E+06
	0,5	45650,54	-6,11	-5,30E+05	37,35	2,81E+11	3,24E+06
	2,5	226106,15	-4,12	-3,50E+05	16,95	1,22E+11	1,44E+06
	10	874613,11	3,25	2,99E+05	10,59	8,91E+10	9,71E+05
	20	1790999,03	13,39	1,21E+06	179,35	1,48E+12	1,63E+07
Prom	6,61	591105,89					
Sum					285,32	2,28E+12	2,55E+07
r	1,00						

Tabla A4. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva de calibración promedio de rango bajo.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	0,2	17773,05	-6,41	-5,58E+05	41,09	3,12E+11	3,58E+06
	0,5	43991,56	-6,11	-5,32E+05	37,35	2,83E+11	3,25E+06
	2,5	218214,39	-4,12	-3,58E+05	16,95	1,28E+11	1,47E+06
	10	857620,06	3,25	2,82E+05	10,59	7,93E+10	9,16E+05
	20	1742907,96	13,39	1,17E+06	179,35	1,36E+12	1,56E+07
Prom	6,61	576101,40					
Sum					285,32	2,16E+12	2,48E+07
r	1,00						

Tabla A5. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva 1 de calibración de rango alto.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	1	5487,17	-65,46	-3,55E+05	4284,51	1,26E+11	2,32E+07
	5	28820,04	-61,46	-3,31E+05	3776,82	1,10E+11	2,04E+07
	25	142521,52	-41,54	-2,18E+05	1725,24	4,73E+10	9,04E+06
	100	556457,94	34,91	1,96E+05	1218,71	3,86E+10	6,86E+06
	200	1065480,56	133,55	7,05E+05	17835,60	4,98E+11	9,42E+07
Prom	66,47	359753,45					
Sum					28840,88	8,19E+11	1,54E+08
r	0,9999						

Tabla A6. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva 2 de calibración de rango alto.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	1	5214,90	-65,46	-3,55E+05	4284,51	1,26E+11	2,32E+07
	5	28721,98	-61,46	-3,31E+05	3776,82	1,10E+11	2,04E+07
	25	142483,96	-41,54	-2,18E+05	1725,24	4,73E+10	9,04E+06
	100	562215,00	34,91	2,02E+05	1218,71	4,09E+10	7,06E+06
	200	1068627,42	133,55	7,09E+05	17835,60	5,02E+11	9,46E+07
Prom	66,47	361452,65					
Sum					28840,88	8,26E+11	1,54E+08
r	0,9998						

Tabla A7. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva 3 de calibración de rango alto.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	1	5474,26	-65,46	-3,55E+05	4284,51	1,26E+11	2,32E+07
	5	28847,16	-61,46	-3,31E+05	3776,82	1,10E+11	2,04E+07
	25	140957,50	-41,54	-2,19E+05	1725,24	4,80E+10	9,10E+06
	100	558656,68	34,91	1,99E+05	1218,71	3,94E+10	6,93E+06
	200	1060716,20	133,55	7,01E+05	17835,60	4,91E+11	9,36E+07
Prom	66,47	358930,36					
Sum					28840,88	8,14E+11	1,53E+08
r	0,9998						

Tabla A8. Determinación del coeficiente de correlación (r) en la curva de calibración promedio de rango alto.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2$
	1	5392,11	-65,46	-3,55E+05	4284,51	1,26E+11	2,32E+07
	5	28796,40	-61,46	-3,31E+05	3776,82	1,10E+11	2,04E+07
	25	141987,66	-41,54	-2,18E+05	1725,24	4,75E+10	9,06E+06
	100	559109,87	34,91	1,99E+05	1218,71	3,96E+10	6,95E+06
	200	1064941,39	133,55	7,05E+05	17835,60	4,97E+11	9,41E+07
Prom	66,47	360045,49					
Sum					28840,88	8,20E+11	1,54E+08
r	0,9998						

ANEXO 3

Cálculo para la determinación del coeficiente de determinación (r^2) en todas las curvas de calibración de rango bajo y alto.

Tabla A9. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva 1 de calibración de rango bajo.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
0,2	17450,01	-543979,38	2,96E+11	17671,91	-543757,48	2,96E+11
0,5	42789,22	-518640,17	2,69E+11	42370,16	-519059,23	2,69E+11
2,5	212027,25	-349402,14	1,22E+11	209900,62	-351528,77	1,24E+11
10	837371,06	275941,67	7,61E+10	841423,19	279993,80	7,84E+10
20	1697509,40	1136080,01	1,29E+12	1695795,22	1134365,83	1,29E+12
Prom	561429,39					
Sum			2,05E+12			2,05E+12
r^2	1,00					

Tabla A10. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva 2 de calibración de rango bajo.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
0,2	17775,46	-557988,73	3,11E+11	17486,59	-558277,60	3,12E+11
0,5	43767,24	-531996,95	2,83E+11	43953,98	-531810,21	2,83E+11
2,5	217363,74	-358400,45	1,28E+11	218636,40	-357127,79	1,28E+11
10	858812,31	283048,12	8,01E+10	856823,89	281059,70	7,90E+10
20	1741102,18	1165337,99	1,36E+12	1741929,65	1166165,46	1,36E+12
Prom	575764,19					
Sum			2,16E+12			2,16E+12
r^2	1,00					

Tabla A11. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva 3 de calibración de rango bajo.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
0,2	18071,36	-573036,75	3,28E+11	18160,64	-572947,47	3,28E+11
0,5	44764,10	-546344,02	2,98E+11	45650,54	-545457,57	2,98E+11
2,5	223042,20	-368065,92	1,35E+11	226106,15	-365001,96	1,33E+11
10	881789,57	290681,46	8,45E+10	874613,11	283505,00	8,04E+10
20	1787873,32	1196765,21	1,43E+12	1790999,03	1199890,92	1,44E+12
Prom	591108,11					
Sum				2,28E+12		2,28E+12
r^2	1,00					

Tabla A12. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva de calibración promedio de rango bajo.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
0,2	17765,61	-558334,95	3,12E+11	17773,05	-558327,51	3,12E+11
0,5	43773,52	-532327,04	2,83E+11	43991,56	-532109,00	2,83E+11
2,5	217477,73	-358622,83	1,29E+11	218214,39	-357886,17	1,28E+11
10	859324,32	283223,76	8,02E+10	857620,06	281519,50	7,93E+10
20	1742161,63	1166061,07	1,36E+12	1742907,96	1166807,40	1,36E+12
Prom	576100,56					
Sum				2,16E+12		2,16E+12
r^2	1,00					

Tabla A13. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva 1 de calibración de rango alto.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
1	10984,93	-348769,96	1,22E+11	5487,17	-354267,72	1,26E+11
5	32299,46	-327455,43	1,07E+11	28820,04	-330934,85	1,10E+11
25	138434,15	-221320,74	4,90E+10	142521,52	-217233,37	4,72E+10
100	545746,08	185991,19	3,46E+10	556457,94	196703,05	3,87E+10
200	1071309,86	711554,97	5,06E+11	1065480,56	705725,67	4,98E+11
Prom	359754,89					
Sum				8,19E+11		8,19E+11
r^2	0,9998					

Tabla A14. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva 2 de calibración de rango alto.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
1	11216,54	-350236,24	1,23E+11	5214,90	-356237,88	1,27E+11
5	32620,68	-328832,10	1,08E+11	28721,98	-332730,80	1,11E+11
25	139201,57	-222251,21	4,94E+10	142483,96	-218968,82	4,79E+10
100	548225,89	186773,11	3,49E+10	562215,00	200762,22	4,03E+10
200	1075999,21	714546,43	5,11E+11	1068627,42	707174,64	5,00E+11
Prom	361452,78					
Sum			8,26E+11			8,26E+11
r^2	0,9996					

Tabla A15. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva 3 de calibración de rango alto.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
1	11286,19	-347644,08	1,21E+11	5474,26	-353456,01	1,25E+11
5	32531,91	-326398,36	1,07E+11	28847,16	-330083,11	1,09E+11
25	138323,98	-220606,29	4,87E+10	140957,50	-217972,77	4,75E+10
100	544321,04	185390,77	3,44E+10	558656,68	199726,41	3,99E+10
200	1068188,22	709257,95	5,03E+11	1060716,20	701785,93	4,93E+11
Prom	358930,27					
Sum			8,13E+11			8,14E+11
r^2	0,9996					

Tabla A16. Determinación del coeficiente de determinación (r^2) en la curva promedio de calibración de rango alto.

x_i	\hat{y} (estim)	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	$y_i(\text{exp})$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
1	11162,45	-348881,25	1,22E+11	5392,11	-354653,38	1,26E+11
5	32483,78	-327559,92	1,07E+11	28796,40	-331249,09	1,10E+11
25	138652,33	-221391,37	4,90E+10	141987,66	-218057,83	4,75E+10
100	546094,22	186050,52	3,46E+10	559109,87	199064,38	3,96E+10
200	1071825,70	711782,00	5,07E+11	1064941,39	704895,90	4,97E+11
Prom	360043,70					
Sum			8,19E+11			8,20E+11
r^2	0,9997					

ANEXO 4

Cálculo para la determinación de la desviación estándar relativa (%RSD) en los factores respuestas (FR) en todas las curvas de calibración de rango bajo y alto.

Tabla A17. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva 1 de rango bajo mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta (FR)
0,2	17671,91	88350,73
0,5	42370,16	84964,62
2,5	209900,62	84182,49
10	841423,19	85302,43
20	1695795,22	84781,28
	σ_{FR}	1635,80
	\bar{x}_{FR}	85516,31
	%RSD	1,91

Tabla A18. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva 2 de rango bajo mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
0,2	17486,59	87424,21
0,5	43953,98	88140,64
2,5	218636,40	87686,05
10	856823,89	86863,74
20	1741929,65	87087,77
	σ_{FR}	501,96
	\bar{x}_{FR}	87440,48
	%RSD	0,57

Tabla A19. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva 3 de rango bajo mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
0,2	18160,64	90794,10
0,5	45650,54	91542,75
2,5	226106,15	90681,86
10	874613,11	88667,18
20	1790999,03	89541,00
	σ_{FR}	1135,96
	\bar{x}_{FR}	90245,38
	%RSD	1,26

Tabla A20. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva promedio de rango bajo mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
0,2	17773,05	88856,35
0,5	43991,56	88216,01
2,5	218214,39	87516,80
10	857620,06	86944,45
20	1742907,96	87136,68
	σ_{FR}	793,62
	\bar{x}_{FR}	87734,06
	%RSD	0,90

Tabla A21. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva 1 de rango alto mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
1	5487,17	5412,47
5	28820,04	5747,69
25	142521,52	5715,95
100	556457,94	5488,83
200	1065480,56	5326,87
	σ_{FR}	186,00
	\bar{x}_{FR}	5538,36
	%RSD	3,36

Tabla A22. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva 2 de rango alto mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
1	5214,90	5143,91
5	28721,98	5728,13
25	142483,96	5714,44
100	562215,00	5545,62
200	1068627,42	5342,60
	σ_{FR}	250,78
	\bar{x}_{FR}	5494,94
	%RSD	4,56

Tabla A23. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva 3 de rango alto mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
1	5474,26	5399,74
5	28847,16	5753,09
25	140957,50	5653,22
100	558656,68	5510,52
200	1060716,20	5303,05
	σ_{FR}	182,77
	\bar{x}_{FR}	5523,93
	%RSD	3,31

Tabla A24. Determinación del porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) de la curva promedio de rango alto mediante los factores de respuesta (FR) de cada nivel de concentración.

Concentración (x_i)	Señal (y_i)	Factor respuesta
1	5392,11	5318,71
5	28796,40	5742,97
25	141987,66	5694,54
100	559109,87	5514,99
200	1064941,39	5324,17
	σ_{FR}	199,42
	\bar{x}_{FR}	5519,08
	%RSD	3,61

ANEXO 5

Se aplicó el método de los mínimos cuadrados a todos los valores obtenidos en las curvas de calibrado. A modo de ejemplo a continuación se muestra el cálculo de la pendiente y el intercepto sólo a las curvas de calibrado promedio de rango bajo y alto.

Tabla A25. Método de los mínimos cuadrados aplicado a la curva de calibración promedio de rango bajo.

	x_i	y_i	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	0,2	17773,05	41,11	-5,58E+05	3,58E+06
	0,5	43991,56	37,37	-5,32E+05	3,25E+06
	2,5	218214,39	16,96	-3,58E+05	1,47E+06
	10	857620,06	10,58	2,82E+05	9,16E+05
	20	1742907,96	179,30	1,17E+06	1,56E+07
Prom	6,61	576101			
Sum			285,32		2,48E+07
Pendiente (b)	87082,18				
Intercepto (a)	347,47				
Ecuación de la recta	$y = 87082,18x + 347,47$				

Tabla A26. Método de los mínimos cuadrados aplicado a la curva de calibración promedio de rango alto.

	x_i	y_i	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	1	5392,11	4284,51	-3,55E+05	2,32E+07
	5	28796,40	3776,82	-3,31E+05	2,04E+07
	25	141987,66	1725,24	-2,18E+05	9,06E+06
	100	559109,87	1218,71	1,99E+05	6,95E+06
	200	1064941,39	17835,60	7,05E+05	9,41E+07
Prom	66,47	360045			
Sum			28840,88		1,54E+08
Pendiente (b)	5329,83				
Intercepto (a)	5759,14				
Ecuación de la recta	$y = 5329,83x + 5759,14$				

Así mismo se calcularon las desviaciones estándar para la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a) para todas las curvas de calibrado. A modo de ejemplo se muestra el cálculo sólo de las curvas de calibrado promedio de rango bajo y alto.

Tabla A27. Cálculo de la desviación estándar de la regresión en la curva de calibrado promedio de rango bajo.

	Concentración (x_i)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	x_i^2
	0,2	-5,60	4284,51	1,03
	0,5	-1,60	3776,82	25,14
	2,5	18,32	1725,24	621,70
	10	94,77	1218,71	10277,90
	20	193,41	17835,60	40008,00
Prom	66,47			
Sum			46758,41	50933,78
$S_{\frac{y}{x}}$	9571,12			
S_b	44,26			
S_a	4467,36			

Tabla A28. Cálculo de la desviación estándar de la regresión en la curva de calibrado promedio de rango alto.

	Concentración (x_i)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	x_i^2
	1	-6,41	41,11	0,04
	5	-6,11	37,37	0,25
	25	-4,12	16,96	6,22
	100	3,25	10,58	97,30
	200	13,39	179,30	400,08
Prom	6,61			
Sum			285,32	503,88
$S_{\frac{y}{x}}$	1162,15			
S_b	68,80			
S_a	690,68			

ANEXO 6

En la Figura 1A y 2A se muestra la representación gráfica de la regresión lineal para la curva promedio de rango bajo y alto respectivamente.

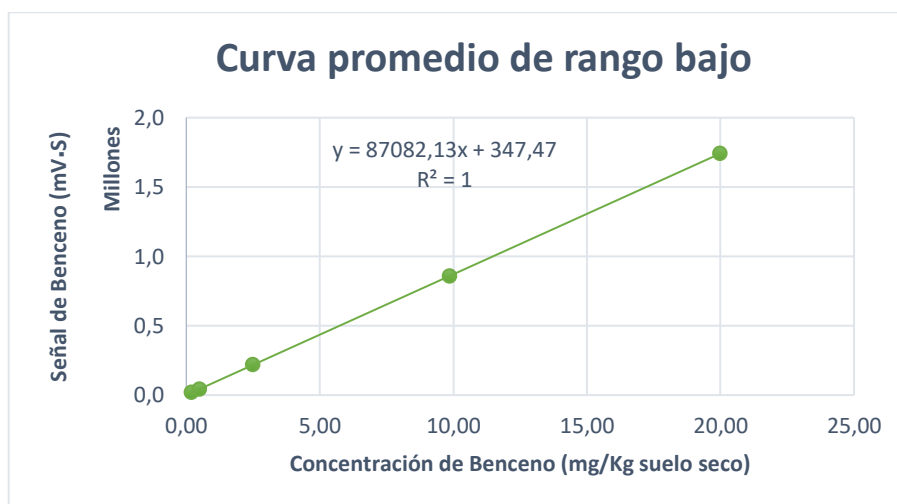


Figura 1A. Curva de calibrado promedio de rango bajo

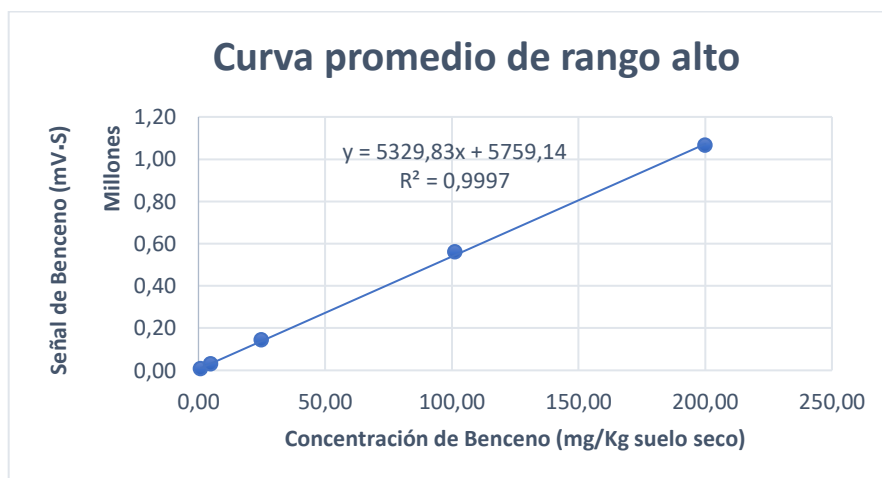


Figura 2A. Curva de calibrado promedio de rango alto

ANEXO 7

Se determinaron los coeficientes de variación (%CV) en todos los niveles de concentración de las curvas de calibrado individuales, además de los coeficientes de variación de Horwitz en condiciones de repetibilidad asociado a las respectivas concentraciones.

Tabla A29. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva 1 de rango bajo.

Curva 1					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg ⁻¹)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	%CV (Experimental)	
0,2	17646,07	17697,31	17672,36	0,14	10,19
0,5	42564,76	41417,81	43127,90	2,06	8,88
2,5	218027,57	200516,75	211157,54	4,20	6,97
10	846397,25	845325,19	832547,14	0,92	5,67
20	1693412,48	1699159,63	1694813,54	0,18	5,10

Tabla A30. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva 2 de rango bajo.

Curva 2					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg ⁻¹)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	%CV (Experimental)	
0,2	17969,52	16989,32	17500,93	2,80	10,19
0,5	43294,15	43815,84	44751,94	1,68	8,88
2,5	220409,32	217304,77	218195,11	0,73	6,97
10	855134,82	854085,95	861250,89	0,45	5,67
20	1715857,55	1766056,61	1743874,78	1,44	5,10

Tabla A31. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva 3 de rango bajo.

Curva 3					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg⁻¹)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	%CV (Experimental)	
0,2	18262,57	18165,22	18054,12	0,57	10,19
0,5	45640,88	46287,79	45022,95	1,39	8,88
2,5	223986,74	227491,53	226840,19	0,82	6,97
10	875312,49	875312,49	873214,34	0,14	5,67
20	1784815,43	1789087,12	1799094,53	0,41	5,10

Tabla A32. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva 1 de rango alto.

Curva 1					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg⁻¹)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	%CV (Experimental)	
1	5472,37	5734,04	5255,09	4,37	7,98
5	28656,71	29136,16	28667,26	0,95	6,28
25	143907,02	140518,44	143139,11	1,25	4,93
100	552270,93	548871,95	568230,93	1,86	3,99
200	1058983,73	1064266,19	1073191,77	0,67	3,60

Tabla A33. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva 2 de rango alto.

Curva 2					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg⁻¹)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	%CV (Experimental)	
1	5349,79	5228,77	5066,13	2,73	7,98
5	29586,95	28560,91	28018,08	2,77	6,28
25	140956,56	142345,97	144149,36	1,12	4,93
100	562590,21	559937,01	564117,79	0,38	3,99
200	1063301,85	1071609,23	1070971,17	0,43	3,60

Tabla A34. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva 3 de rango alto.

Curva 3					%CV
Concentración (mg×Kg⁻¹)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	%CV (Experimental)	Horwitz (Máximo permitido)
1	5610,96	5286,51	5525,3	3,07	7,98
5	28814,8	28217,34	29509,35	2,24	6,28
25	141337,98	141334,33	140200,2	0,47	4,93
100	555146,98	556296,46	564526,59	0,92	3,99
200	1044210,6	1080073,18	1057864,83	1,71	3,60

ANEXO 8

Se determinaron los coeficientes de variación (%CV) en todos los niveles de concentración de las curvas de calibrado promedio, además de los coeficientes de variación de Horwitz en condiciones de reproducibilidad asociado a las respectivas concentraciones.

Tabla A35. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva promedio de rango bajo.

Curva promedio de rango bajo					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg⁻¹)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	%CV (Experimental)	
0,2	17671,91	17486,59	18160,64	1,96	13,59
0,5	42370,16	43953,98	45650,54	3,73	11,84
2,5	209900,62	218636,40	226106,15	3,72	9,30
10	841423,19	856823,89	874613,11	1,94	7,56
20	1695795,22	1741929,65	1790999,03	2,73	6,80

Tabla A36. Coeficientes de variación de los niveles de concentración en la curva promedio de rango alto.

Curva promedio de rango alto					%CV Horwitz (Máximo permitido)
Concentración (mg×Kg⁻¹)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	%CV (Experimental)	
1	5487,17	5214,90	5474,26	2,85	10,65
5	28820,04	28721,98	28847,16	0,23	8,37
25	142521,52	142483,96	140957,50	0,63	6,57
100	556457,94	562215,00	558656,68	0,52	5,32
200	1065480,56	1068627,42	1060716,20	0,37	4,81

ANEXO 9

Tabla A37. Datos para determinar los índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) en las curvas de rango bajo.

Concentración (mg×Kg ⁻¹)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	\bar{x}	σ	σ^2
0,2	17671,91	17486,59	18160,64	17773,05	348,22	1,2E+05
0,5	42370,16	43953,98	45650,54	43991,56	1640,51	2,6E+06
2,5	209900,62	218636,40	226106,15	218214,39	8111,00	6,6E+07
10	841423,19	856823,89	874613,11	857620,06	16609,27	2,7E+08
20	1695795,22	1741929,65	1790999,03	1742907,96	47609,44	2,3E+09
					$\Sigma\sigma^2$	2,6E+09
					$\sigma_{\bar{x}}$	735466,66

Tabla A38. Datos para determinar los índices de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) en las curvas de rango alto.

Concentración (mg×Kg ⁻¹)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	\bar{x}	σ	σ^2
1	5487,17	5214,90	5474,26	5392,11	153,60	23594,21
5	28820,04	28721,98	28847,16	28796,40	65,86	4337,13
25	142521,52	142483,96	140957,50	141987,66	892,34	8,0E+05
100	556457,94	562215,00	558656,68	559109,87	2905,17	8,4E+06
200	1065480,56	1068627,42	1060716,20	1064941,39	3983,07	1,6E+07
					$\Sigma\sigma^2$	2,5E+07
					$\sigma_{\bar{x}}$	452647,51

ANEXO 10

Tabla A39. Diferencia entre los valores de los niveles de concentración en cada una de las curvas de calibrado de rango bajo.

Curvas de calibrado Combinaciones mg×Kg⁻¹	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,2 - 0,5	24698,24	26467,39	27489,90
0,2 - 2,5	192228,71	201149,81	207945,52
0,2 - 10	823751,28	839337,30	856452,47
0,2 - 20	1678123,30	1724443,06	1772838,39
0,5 - 2,5	167530,46	174682,42	180455,61
0,5 - 10	799053,04	812869,91	828962,57
0,5 - 20	1653425,06	1697975,67	1745348,49
2,5 - 10	631522,57	638187,49	648506,95
2,5 - 20	1485894,60	1523293,25	1564892,87
10 - 20	854372,02	885105,76	916385,92
Criterio de aceptación: Índice de reproducibilidad (R)	≤ 2059306,66		

Tabla A40 Diferencia entre los valores de los niveles de concentración en cada una de las curvas de calibrado de rango alto.

Curvas de calibrado Combinaciones mg×Kg⁻¹	Curva 1	Curva 2	Curva 3
1-5	23332,88	23507,08	23372,91
1-25	137034,36	137269,07	135483,25
1-100	550970,77	557000,11	553182,42
1-200	1059993,40	1063412,52	1055241,95
5-25	113701,48	113761,98	112110,34
5-100	527637,89	533493,02	529809,51
5-200	1036660,52	1039905,44	1031869,04
25-100	413936,41	419731,04	417699,17
25-200	922959,04	926143,45	919758,70
100-200	509022,63	506412,41	502059,53
Criterio de aceptación: Índice de reproducibilidad (R)	≤ 1267413,02		

ANEXO 11

Se presenta la tabla para determinar el F crítico, donde se considera una distribución unilateral con un nivel de confianza del 95%.

TABLA F
F DISTRIBUCIÓN ($\alpha=0,05$)

F crítico	Grados de libertad del numerador										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	
Grados de libertad del denominador	1	161.44622	199.49948	215.70668	224.58335	230.16037	233.98752	236.76694	238.88424	240.54316	241.88193
	2	18.51276	19.00003	19.16419	19.24673	19.29629	19.32949	19.35314	19.37087	19.38474	19.39588
	3	10.12796	9.55208	9.27662	9.11717	9.01343	8.94067	8.88673	8.84523	8.81232	8.78549
	4	7.70865	6.94428	6.59139	6.38823	6.25607	6.16313	6.09421	6.04103	5.99880	5.96435
	5	6.60788	5.78615	5.40945	5.19216	5.05034	4.95029	4.87586	4.81833	4.77246	4.73506
	6	5.98737	5.14325	4.75706	4.53369	4.38737	4.28386	4.20667	4.14681	4.09901	4.05996
	7	5.59146	4.73742	4.34683	4.12031	3.97152	3.86598	3.78705	3.72572	3.67667	3.63653
	8	5.31764	4.45897	4.06618	3.83785	3.68750	3.58058	3.50046	3.43810	3.38812	3.34717
	9	5.11736	4.25649	3.86254	3.63309	3.48166	3.37376	3.29274	3.22959	3.17890	3.13727
	10	4.96459	4.10282	3.70827	3.47805	3.32584	3.21718	3.13547	3.07166	3.02038	2.97824
	11	4.84434	3.98231	3.58743	3.35669	3.20388	3.09461	3.01233	2.94798	2.89622	2.85362
	12	4.74722	3.88529	3.49030	3.25916	3.10587	2.99612	2.91335	2.84857	2.79638	2.75339
	13	4.66719	3.80557	3.41053	3.17912	3.02543	2.91527	2.83210	2.76691	2.71436	2.67102
	14	4.60011	3.73889	3.34389	3.11225	2.95825	2.84773	2.76420	2.69867	2.64579	2.60216
	15	4.54307	3.68232	3.28738	3.05557	2.90130	2.79046	2.70663	2.64080	2.58763	2.54371
	16	4.49400	3.63372	3.23887	3.00692	2.85241	2.74131	2.65720	2.59109	2.53767	2.49351
	17	4.45132	3.59154	3.19677	2.96471	2.81000	2.69866	2.61430	2.54796	2.49429	2.44992
	18	4.41386	3.55456	3.15991	2.92775	2.77285	2.66130	2.57672	2.51016	2.45628	2.41170
	19	4.38075	3.52189	3.12735	2.89511	2.74006	2.62832	2.54354	2.47677	2.42270	2.37793
	20	4.35125	3.49283	3.09839	2.86608	2.71089	2.59898	2.51401	2.44707	2.39282	2.34787
	21	4.32479	3.46679	3.07247	2.84010	2.68478	2.57271	2.48758	2.42046	2.36605	2.32095
	22	4.30094	3.44336	3.04912	2.81671	2.66127	2.54906	2.46377	2.39650	2.34193	2.29669
	23	4.27934	3.42213	3.02800	2.79554	2.64	2.52766	2.44223	2.37481	2.32011	2.27472
	24	4.25968	3.40283	3.00879	2.77629	2.62065	2.50819	2.42263	2.35508	2.30024	2.25474
	25	4.24170	3.38520	2.99124	2.75871	2.60299	2.49041	2.40473	2.33706	2.28210	2.23648
	26	4.22520	3.36901	2.97516	2.74260	2.58679	2.47411	2.38831	2.32053	2.26545	2.21972
	27	4.21001	3.35413	2.96035	2.72777	2.57189	2.45911	2.37321	2.30531	2.25013	2.20430
	28	4.19598	3.34039	2.94668	2.71407	2.55812	2.44526	2.35926	2.29127	2.23598	2.19004
	29	4.18297	3.32766	2.93403	2.70140	2.54538	2.43244	2.34634	2.27825	2.22288	2.17685
	30	4.17089	3.31583	2.92228	2.68963	2.53355	2.42052	2.33435	2.26616	2.21070	2.16458

ANEXO 12

Se determinaron los coeficientes de variación (%CV) en los cuatro niveles de fortificado a partir de las concentraciones experimentales obtenidas al interpolar la señal en las respectivas curvas de calibrado promedio, además se calcularon de los coeficientes de variación de Horwitz en condiciones de repetibilidad asociado a las respectivas concentraciones.

Tabla A41. Términos utilizados para el cálculo del coeficiente de variación de las muestras fortificadas.

	Curva de rango bajo	Curva de rango alto		
Concentración real (mg×Kg ⁻¹)	12,6	29,9	90,4	150,7
N° de réplicas	Concentración experimental (mg×Kg ⁻¹)			
1	12,36	29,36	92,42	147,63
2	13,39	29,61	90,18	147,59
3	13,34	30,17	95,82	148,34
4	12,98	30,37	90,27	151,57
5	12,40	30,42	97,18	148,03
\bar{x}	12,89	29,99	93,18	148,63
σ	0,50	0,47	3,20	1,67
$\%CV_{Experimental}$	3,85	1,58	3,44	1,12
$\%CV_{Horwitz}$ (Máximo permitido)	5,46	4,80	4,06	3,76

ANEXO 13

Se determinaron los coeficientes de variación (%CV) en los cuatro niveles de fortificado a partir de las concentraciones experimentales obtenidas al interpolar la señal promedio en las respectivas curvas de calibrado promedio, además se calcularon de los coeficientes de variación de Horwitz en condiciones de reproducibilidad asociado a las respectivas concentraciones.

Tabla A42. Términos utilizados para el cálculo del coeficiente de variación de la muestra $12,6 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en condiciones de reproducibilidad.

Días	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Señal Promedio	Concentración Experimental	
1	1035794,05	1032474,79	1014670,18	1027646,34	11,80	
2	1076469,66	1166654,09	1130828,99	1124650,91	12,91	
3	1164590,14	1166320,17	1157969,09	1162959,80	13,35	
4	1156590,47	1146941,83	1169378,80	1157637,03	13,29	
5	1148306,61	1130828,99	1135740,20	1138291,93	13,07	
					$\bar{x}_{\text{Concentración Experimental}}$	12,88
					σ	0,63
					%CV	4,91
					%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)	7,28

Tabla A43. Términos utilizados para el cálculo del coeficiente de variación de la muestra $29,9 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en condiciones de reproducibilidad.

Días	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Señal Promedio	Concentración Experimental	
1	172083,9	171723,05	175134,37	172980,44	31,37	
2	170379,77	175562,06	179354,67	175098,83	31,77	
3	163583,68	175934,9	171226,97	170248,52	30,86	
4	176000,76	175626,67	177210,71	176279,38	31,99	
5	166545,37	167637,85	167905,46	167362,89	30,32	
					$\bar{x}_{\text{Concentración Experimental}}$	31,26
					σ	0,68
					%CV	2,18
					%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)	6,40

Tabla A44. Términos utilizados para el cálculo del coeficiente de variación de la muestra $90,4 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en condiciones de reproducibilidad.

Días	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Señal Promedio	Concentración Experimental	
1	525478,44	533856,5	517768,76	525701,23	97,55	
2	492190,44	508142,49	496464,36	498932,43	92,53	
3	479908,23	489229,74	495513,48	488217,15	90,52	
4	532809,59	518340,90	522498,83	524549,77	97,34	
5	498329,40	486421,85	486882,95	490544,73	90,96	
					$\bar{x}_{\text{Concentración Experimental}}$	93,78
					σ	3,43
					%CV	3,66
					%CV _{Horwitz} (Máximo permitido)	5,41

Tabla A45. Términos utilizados para el cálculo del coeficiente de variación de la muestra $150,7 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ en condiciones de reproducibilidad.

Días	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Señal Promedio	Concentración Experimental	
1	859388,16	815525,34	837760,68	837558,06	156,06	
2	791231,39	784105,25	819955,84	798430,83	148,72	
3	826318,65	788859,73	794349,21	803175,86	149,61	
4	818263,59	795397,34	826229,10	813296,68	151,51	
5	792604,57	792364,05	796367,00	793778,54	147,85	
					$\bar{x}_{\text{Concentración Experimental}}$	150,75
					σ	3,26
					$\%CV$	2,17
					$\%CV_{\text{Horwitz}}$ (Máximo permitido)	5,01

ANEXO 14

Se presenta la tabla para determinar el t crítico del t de Student considerando un nivel de confianza del 95%.

TABLA DE LA DISTRIBUCIÓN t-Student

2 colas		80%	90%	95%	98%	99%
$\alpha/2$		0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015
ν						
1 cola						
α		0.10	0.05	0.025	0.01	0.0015
ν						
1		3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2		1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3		1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4		1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5		1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6		1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7		1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8		1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9		1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10		1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11		1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12		1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13		1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14		1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15		1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16		1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17		1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18		1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19		1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20		1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21		1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22		1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23		1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24		1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25		1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26		1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27		1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28		1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29		1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30		1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40		1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60		1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120		1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞		1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

ANEXO 15

El presente seminario de título fue presentado en el XIII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental, y el XIV Encuentro de Química Analítica y Ambiental 2018 con el título de “Validación de una metodología para la determinación directa de benceno en suelos mediante HS-GC-FID para su aplicación en cinéticas de biorremediación de benceno en suelos co-contaminados con Hg (II)”.



XIII LASEAC
LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON
ENVIRONMENTAL & ANALYTICAL CHEMISTRY



XIV ENCUENTRO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y AMBIENTAL
DIVISIÓN DE QUÍMICA ANALÍTICA Y AMBIENTAL
SOCIEDAD CHILENA DE QUÍMICA

12 -15 noviembre 2018 • Hotel La Bahía Enjoy • La Serena • Chile

Validación de una metodología para la determinación directa de benceno en suelos mediante HS-GC-FID para su aplicación en cinéticas de biorremediación de benceno en suelos co-contaminados con Hg(II)

Rojas, N^{1,2}; Cajas, D^{1,3}; Mamani, E¹; Pérez M¹; Rojas LA¹

¹Universidad Católica del Norte, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Av. Angamos 0610, Antofagasta, Chile
luis.rojas02@ucn.cl

²Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Pregrado, Santiago, Chile. nataly.rojas.m@ug.uchile.cl

³Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Santiago, Chile. drcajas@uc.cl

Palabras clave: Validación, benceno, biorremediación

Es de gran preocupación mundial el aumento de contaminantes en suelos, generado por causas antropogénicas tales como la quema de combustibles fósiles y la extracción minera. Al menos un tercio de los sitios contaminados con compuestos orgánicos contienen además compuestos inorgánicos [1]. Se considera que alrededor del 40% de los sitios contaminados en E.E.U.U. poseen contaminantes orgánicos y metales [2, 3]. Ejemplo de esto son las plantas petroquímicas que producen hidrocarburos aromáticos como Benceno, Tolueno, Etilbenceno, y Xilenos (BTEX) a partir de la fracción volátil del petróleo y; las actividades mineras que liberan metales pesados tales como Hg⁺², Pb⁺², Cu⁺² y Zn⁺². Las concentraciones de ambos tipos de contaminantes se están distribuyendo peligrosamente por los suelos.

Chile es uno de los productores mineros más importante del mundo donde la principal fuente de energía proviene de combustibles fósiles. Asimismo, la extracción artesanal e industrial de oro ha utilizado mercurio para el proceso de amalgamación generando contaminación en suelos. De esta forma, en el presente trabajo se utilizó un suelo contaminado con benceno y mercurio como una aproximación a una situación real de co-contaminación. Se aplicó una técnica de remediación a través de la utilización de bacterias especializadas que remuevan benceno aún en concentraciones tóxicas de mercurio.

El objetivo de este trabajo es validar una metodología para la determinación de benceno en muestras de suelo mediante un sistema de extracción en espacio de cabeza acoplado a un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (HS-GC-FID) que permita monitorear la cinética de remoción de benceno en un suelo co-contaminado con Hg(II) durante un proceso de biorremediación bacteriana con la cepa modificada genéticamente *Cupriavidus*

metallidurans MSR33, altamente resistente a mercurio [4].

Los resultados de la validación de la metodología estuvieron dentro de los criterios de aceptabilidad, obteniéndose un Límite de Detección y de Cuantificación de 0,2 y 0,6 ppm respectivamente. El coeficiente de correlación (r^2) fue superior a 0,9980 y el de variación (%CV) inferior a los valores de Horwitz. La repetibilidad y reproducibilidad de la curva de calibrado demostró que todos sus valores estaban por debajo de los respectivos índices. Se determinó además la reproducibilidad y repetibilidad de muestras fortificadas en 4 niveles, indicando que las desviaciones estándar relativas estaban por debajo de lo indicado por Horwitz. Asimismo, las recuperaciones de los fortificados se encontraron dentro del rango de 90 y 110%. Podemos concluir que la medición de benceno con la metodología validada, entrega información rápida y veraz, pudiéndose aplicar directamente en viales con microcosmos de suelo contaminados con Benceno 200 ppm y Hg(II) 2 ppm. La determinación de benceno permitió demostrar que este proceso de biorremediación es una novedosa tecnología costo-efectiva y amigable con el medioambiente, aplicable a suelos impactados con BTEX en presencia de metales tóxicos.

Agradecimientos

Proyecto Fondecyt 11130117 y Proyecto Semilla VRIDT-187-2017-UCN (LAR)

Referencias

1. W.W. Kovalick, Springer US (New York) 41, 1991.
2. T.R. Sandrin, A.M. Chech, R.M. Maier, Appl. Environ. Microbiol. 66(19), 4585, 2000.
3. T.R. Sandrin and R.M. Maier, Environ. Health Perspect. 111(8), 1093, 2003.
4. L.A. Rojas, C. Yáñez, M. González, S. Lobos, K. Smalla, M. Seeger. PLoS one 6(3), e17555, 2011.



Validación de una metodología para la determinación directa de benceno en suelos mediante HS-GC-FID para su aplicación en cinéticas de biorremediación de benceno en suelos co-contaminados con Hg(II)

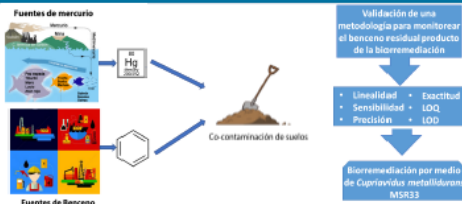
Rojas, N^{1,2}; Cajas, D^{1,3}; Mamami, E¹; Pérez M¹; Rojas LA¹

¹Universidad Católica del Norte, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Antofagasta, Chile.

²Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Pregrado, Santiago, Chile.

³Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Santiago, Chile.

RESUMEN GRÁFICO



1. INTRODUCCIÓN

- Investigaciones estiman que cerca del 40% de los sitios contaminados en EE.UU. dentro de la lista de la EPA se encuentran co-contaminados tanto con metales pesados como por componentes orgánicos^{1,2}.
- La descontaminación de compuestos orgánicos en suelos, mediante el proceso de biorremediación bacteriana, es una de las alternativas más limpias, y de bajo costo^{3,4}. No obstante, su aplicación resulta dificultosa en sitios co-contaminados, dado que se produce un problema de toxicidad del microorganismo ante la presencia de metales tóxicos⁵.
- En este estudio se determinó que la cepa bacteriana *Cupriavidus metallidurans* MSR33 ha demostrado tener la capacidad de degradar compuestos aromáticos tóxicos como benceno, en presencia de metales pesados^{6,7}, particularmente de mercurio, indicando que podría ser utilizada en procesos de biorremediación de sitios co-contaminados.
- Este trabajo requirió de una metodología para determinar benceno en microcosmos de suelos contaminados, sin perturbar; por lo tanto, sin posibilidad del uso de estándar interno (IS). La metodología desarrollada, fue validada analíticamente y a continuación se presentan los resultados

2. OBJETIVO

Validar una metodología analítica para la determinación de benceno mediante extracción por "Headspace" (HS) acoplado a un Cromatógrafo de Gases (GC) con detector de Ionización de flama (FID), sin posibilidad de utilizar IS, para determinar la cinética de biorremediación de benceno en muestras sacrificiales de microcosmos de suelos co-contaminados con Hg(II).

3. METODOLOGÍA

3.1 Preparación de las muestras

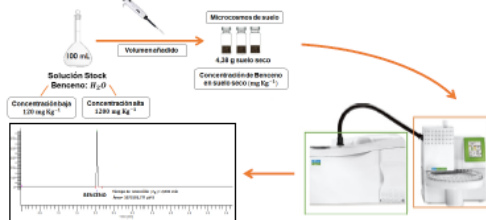


Figura 1. Esquema sobre la preparación y análisis de las muestras con benceno.

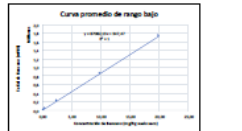


Figura 2. Curva de calibrado promedio de rango bajo.

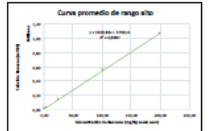


Figura 3. Curva de calibrado promedio de rango alto.

3.2 Biorremediación

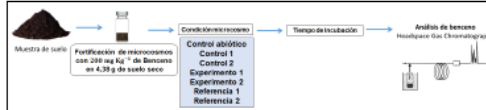


Figura 4. Procedimiento experimental aplicado en el ensayo de biorremediación.

Contacto
Dr. Luis Rojas Araya
luis.rojas@ucn.cl
Nataly Rojas Molina
nataly.rojas@ucn.cl

Agradecimientos

- Proyecto Semilla 187/17, VRDT, UCN.
- Departamento de Química, UCN.
- Facultad de Ciencias, UCN.
- Laboratorio de Servicios de Analíticos del Departamento de Química, UCN-LSA de la Universidad Católica del Norte

4. RESULTADOS

4.1 Validación de la metodología

Tabla 1. Parámetros de validación obtenidos en la curva de rango bajo.

Figura de mérito	Parámetro Evaluado	Curva de rango bajo	Valor criterio
Linealidad	r	1,00	r > 0,995
	r ²	1,00	r ² > 0,990
	%RSD	0,90%	%RSD < 5%
Sensibilidad	Pendiente (b)	y = 07082,13x + 147,47	
Precisión (repetibilidad)	%CV _{repetibilidad}	12,60	NIVEL DE FORTIFICADO (mg Kg ⁻¹) %CV _{repetibilidad} = 1/2 * 2 ^(1-0,99)
		3,85	
Precisión (reproducibilidad)	%CV _{reproducibilidad}	4,91	%CV _{reproducibilidad} = 2/3 * 2 ^(1-0,99)
Exactitud	% Recuperación	102,33	90,00 – 110,00%
Límite de detección (LOD)		0,03 mg Kg ⁻¹	LOD < LOQ
		0,13 mg Kg ⁻¹	

Tabla 2. Parámetros de validación obtenidos en la curva de rango alto.

Figura de mérito	Parámetro Evaluado	Curva de rango alto	Valor criterio
Linealidad	r	0,9998	r > 0,995
	r ²	0,9997	r ² > 0,990
	%RSD	3,61%	%RSD < 5%
Sensibilidad	Pendiente (b)	y = 5329,83x + 5759,14	
Precisión (repetibilidad)	%CV _{repetibilidad}	29,87 90,42 150,70	NIVEL DE FORTIFICADOS (mg Kg ⁻¹) %CV _{repetibilidad} = 1/2 * 2 ^(1-0,99)
		1,58 3,64 1,12	
Precisión (reproducibilidad)	%CV _{reproducibilidad}	2,18 3,66 2,17	%CV _{reproducibilidad} = 2/3 * 2 ^(1-0,99)
Exactitud	% Recuperación	100,40 101,05 98,63	90,00 – 110,00%
Límite de detección (LOD)		4,64 mg Kg ⁻¹	LOD < LOQ
		14,14 mg Kg ⁻¹	

- La metodología para determinar benceno en microcosmos de suelos mediante HS-GC-FID dentro de un proceso de biorremediación fue exitosamente validada.
- La metodología para rango bajo y alto mostró una alta linealidad (r, r² y %RSD).
- Ambas metodologías demostraron ser precisas, exactas, repetibles y reproducibles.
- Los límites de detección y cuantificación están dentro de lo requerido para esta metodología.
- No se requirió de IS para la determinación de benceno mediante esta metodología.

4.2 Biorremediación

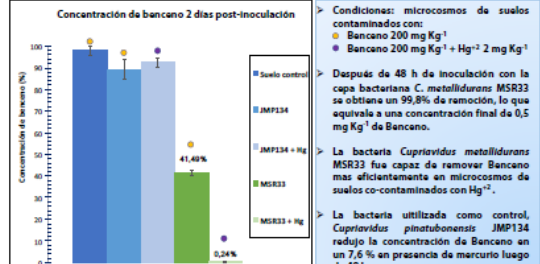


Figura 5. Disminución de la concentración de benceno luego de 2 días de inoculación.

5. CONCLUSIONES

- Se validó la metodología planteada en el objetivo y cumplió con todos los parámetros previamente establecidos, garantizando confiabilidad, veracidad y reproducibilidad en los resultados de la determinación de benceno en microcosmos de suelos utilizados para biorremediación.
- La bacteria *Cupriavidus metallidurans* MSR33 tiene la capacidad de degradar benceno en sitios co-contaminados con benceno y mercurio.
- La metodología analítica validada en este trabajo permitió determinar la cinética de biorremediación de benceno utilizando *C. metallidurans* MSR33, demostrando que es más rápida en presencia de mercurio que en ausencia del mismo.

Referencias

- Sandrin, T. L., Chels, A. M., & Mies, B. M. (2000). A mammalian bioindicator reduces cadmium toxicity during nephrotoxic biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4585-4588.
- Van Landuyt, P., Probst, C., Tobin-Daeghe, S., Echeverría, M., & Lougheg, G. (2014). 457 Progress in management of contaminated sites in Europe. *JRC Reference Report*.
- Datta, A., Datta, M., Datta, R., Purohit, S., & Srinivas, L. M. (2010). Rapid remediation of soil heavily contaminated with hydrocarbons: a comparison of different approaches. *Annals of Microbiology*, 60(1), 241-251.
- Nagu, T. F., Azubuike, C. C., & Ogugha, C. J. (2013). Fertiliser Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Petroleum Hydrocarbons after Amendment with Compost (organic fertiliser) [Soil]. *Microbiology Research International*, 2(5), 1-7.
- Colombo, M., Cavella, L., Bernasconi, S., & Androni, V. (2011). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioremediation with *Sphingomonas chlorophenolica* strain C28: A feasibility study in soils and cupriavidus microcosms. *International Bioremediation and Biodegradation*, 65(1), 151-157.
- Milanesi, R. (2011). Caracterización de la degradación de benceno por la bacteria *Cupriavidus metallidurans* en presencia de Pb²⁺ y Hg²⁺ [Master's thesis]. Universidad Andrés Bello, Vía del Mar, Chile.
- Rojas, L., Yáñez, C., González, M., López, S., Smith, K., Saez, M. (2011). Characterization of a Metallophilic Modified Heavy Metal-Resistant *Cupriavidus metallidurans* Strain MSR33 Generated for Mercury Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 45(12), 6147-6155.