



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
SOCIOSANITARIAS

Aplicación de Extracción en Fase Sólida (SPME
Y SPE) al Control Ambiental y Biológico de la
Exposición a Agentes Químicos en Ambientes
Laborales

D^a. Patricia Marín Carrasco

2014

Universidad de Murcia
Departamento de Ciencias Sociosanitarias



TESIS DOCTORAL:

APLICACIÓN DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME Y SPE) AL CONTROL AMBIENTAL Y BIOLÓGICO DE LA EXPOSICIÓN A AGENTES QUÍMICOS EN AMBIENTES LABORALES

REALIZADA POR: PATRICIA MARÍN CARRASCO

DIRECTORES: DRA. Dña. CELIA ANA PRADO BURGUETE
Jefe de Servicio de Higiene Industrial y Salud Laboral del Instituto de Seguridad y Salud Laboral de la Región de Murcia

DR. D. AURELIO LUNA MALDONADO
Catedrático de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia

Murcia; Marzo de 2014

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Celia Prado Burguete, Jefe de Servicio de Higiene Industrial y Salud Laboral del Instituto de Seguridad y Salud Laboral de la Región de Murcia, directora del presente trabajo, por la que siento gran respeto y admiración, y la persona que ha hecho posible la realización del mismo. Por enseñarme todo lo que sé, por su trabajo, por su ayuda, por su dedicación constante, rigor, apoyo, por su confianza depositada en mí y su inestimable amistad, que espero que perdure en el tiempo.

Agradecimiento especial al Dr. Juan Francisco Periago Jiménez, al que dedico esta tesis, al que siempre he tenido en mente y que sigue con nosotros en nuestros corazones, y sin cuyo apoyo no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Aurelio Luna Maldonado, codirector de la presente tesis, Catedrático de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Murcia, por el apoyo ofrecido para la realización del presente trabajo.

Al Instituto de Seguridad y Salud Laboral de la Región de Murcia, porque gracias a esta institución he recibido la formación y ayuda necesaria para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Universidad de Murcia por el apoyo recibido para la realización de este proyecto.

Mi agradecimiento al Director del Instituto de Seguridad y Salud Laboral, D. Tomás Fuentes Llamas, por facilitar la realización de este trabajo en sus instalaciones.

A M^a José por su ayuda y colaboración en la realización de las experiencias realizadas durante el desarrollo de este trabajo. Al resto de compañeros: Pepito, Alfonso, Mariángeles, Rosita, Rosario, Antonio, Esther e Inma, entre otros, por su valiosa amistad.

A mi padre por el por su continuo apoyo incondicional, por su confianza depositada en mí y, sobre todo, por ser un ejemplo para mí de esfuerzo, dedicación y trabajo.

A mi madre que, aunque ya no esté a mi lado, la siento muy cerca porque perdura en mi recuerdo y a la que tengo que agradecer todos los momentos felices vividos junto a ella.

A mi hermana que es además mi mejor amiga. Gracias por tu compañía y ayuda.

A mi hermano, mis suegros, cuñadas, cuñados, sobrinos, sobrinas, familia en general y amigas por su fundamental apoyo, afecto y cariño.

Especialmente a David, mi marido, por su amor, su apoyo, paciencia y comprensión; y a mis queridos hijos, Herminia y David, por ser la alegría de mi vida y por todo el amor que me dan.

Parte del trabajo y de la experimentación de esta tesis ha sido objeto de publicaciones en revistas especializadas y presentaciones en congresos, que se relacionan a continuación:

- "Application of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry to the determination of volatile organic compounds in end-exhaled breath samples" C. Prado, P. Marín, J.F. Periago. Journal of Chromatography A, 1011, 125-134, 2003.
- "SPE-GC-MS for the sampling and determination of unmetabolized styrene in urine" C. Prado, P. Marín, P. Simon, J.F. Periago. Journal of Chromatography B, 830 (1), 18-24, 2006.
- "A New Approach for Diffusive Sampling Based on SPME for Occupational Exposure Assessment" P. Marín, J. F. Periago, C. Prado. J. Occup. Environ. Hyg. 10(3), 122-131, 2013.
- "Aplicación de SPME/GC-MS a la determinación de COV en aire exhalado" C. Prado, J.F. Periago, P. Marín, 10^{as} Jornadas de Análisis Instrumental JAI, Barcelona 2002.
- "Development of a sampling and analysis method using solid-phase extraction combined with GC-MS for the analysis of unmetabolized styrene in urine" C. Prado, P. Marín, P. Simon, J.F. Periago, IV Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Madrid 2004.
- "Evaluation of styrene from solid-phase extraction cartridges used for on-site urine sampling" C. Prado P. Marín, J. Simon, J.F. Periago, 11^a Jornadas Análisis Instrumental JAI, Barcelona 2005.
- "Aplicación de la extracción en fase sólida al control biológico de la exposición laboral a compuestos orgánicos" C. Prado, P. Marín, J.F. Periago, IV Congreso Internacional de Prevención de Riesgos Laborales y VIII Congreso Andaluz de Seguridad y Salud Laboral, Sevilla 2006.
- "New approach to time-integrated diffusive sampling of environmental contaminants based on SPME" C. Prado, P. Marín, J.F. Periago, 12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis, Zaragoza 2006.

- "Evaluación de un prototipo de muestreador difusivo basado en SPME para la determinación de clorobenceno en aire" P. Marín, C. Prado, J.F. Periago, 1^{er} Congreso de Prevención de Riesgos Laborales, Murcia 2007.
- "Determinación de diclorometano en orina para el control biológico de la exposición laboral a diclorometano" C. Prado, P. Marín, J.F. Periago, 1^{er} Congreso de Prevención de Riesgos Laborales, Murcia 2007.
- "Determinación de cetonas en orina mediante SPME para su aplicación al control biológico" C. Prado, P. Marín, J.F. Periago, XVII Congreso Español de Toxicología, Santiago de Compostela 2007.
- "Application of a prototype of diffusive sampler based on SPME for the determination of sevoflurane in air" P. Marín, J.F. Periago, C. Prado, 12^{as} Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona 2008. Este poster recibió el Premio "CLUB USUARIOS SPME" patrocinado por Sigma-Aldrich Química, a la mejor comunicación tipo cartel que utiliza la técnica de microextracción en fase sólida (SPME).
- "Determination of ketones in urine by SPME for biological monitoring application" C. Prado, P. Marín, J.F. Periago, 12^{as} Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona 2008.
- "Aplicación de un muestreador difusivo basado en SPME para la determinación de tolueno ambiental" P. Marín, J.F. Periago, C. Prado, Simposium de Higiene Industrial, Murcia 2009.
- "Determination of tetrahydrofuran and ketones in urine by headspace technique" C. Prado, P. Marín, J. Alcaraz, J.F. Periago, 28th International Symposium on Chromatography, Valencia 2010.
- "Determinación de diclorometano en orina mediante la técnica de espacio de cabeza" P. Marín, C. Prado, J. Alcaraz, J.F. Periago, II Congreso de Prevención de Riesgos Laborales, Murcia 2011.

La extensión temporal tan amplia en la que transcurren la experimentación, las publicaciones y el propio desarrollo del trabajo que aquí se presenta se ha debido a una serie de hechos que han impedido que este trabajo se realizara de forma continua, como suele ser lo habitual en una tesis doctoral llevada a cabo en una institución académica o de investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Evaluación de la exposición laboral a compuestos orgánicos volátiles	6
1.2 Control ambiental de la exposición laboral	7
1.2.1 <i>Valores de referencia ambientales</i>	8
1.3 Control biológico de la exposición laboral	13
1.3.1 <i>Especímenes biológicos</i>	15
1.3.2 <i>Valores de referencia biológicos</i>	18
1.4 Métodos analíticos para el control ambiental y biológico	21
1.4.1 <i>Medida de la concentración ambiental</i>	21
1.4.1.1 Muestreo activo.....	22
1.4.1.2 Muestreo pasivo	23
1.4.1.3 Técnicas analíticas	28
1.4.2 <i>Métodos para el control biológico</i>	29
1.4.2.1 Espacio de cabeza.....	31
1.4.2.2 Extracción en fase sólida	33
1.4.3 <i>Microextracción en fase sólida para el control ambiental y biológico</i>	34
1.5 Bibliografía	45
2 OBJETIVOS	53
3 MUESTREO PASIVO BASADO EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN LABORAL	57
3.1 Introducción	57
3.2 Experimental	59
3.2.1 <i>Dispositivo de muestreo basado en SPME</i>	59
3.2.2 <i>Determinación de la velocidad de captación por difusión</i>	61
3.2.3 <i>Estudio del comportamiento del muestreador a concentraciones variables de contaminante</i>	64
3.2.4 <i>Estudio del efecto de la temperatura y de la humedad relativa de la atmósfera sobre el comportamiento del muestreador</i>	65
3.2.5 <i>Estudio de la estabilidad del analito en el muestreador</i>	65

3.2.6 Determinación del efecto de la velocidad del aire	66
3.2.7 Sesgo debido a la selección de un adsorbente no ideal.....	66
3.2.8 Estudio del efecto de la adsorción competitiva.....	66
3.2.9 Estudio de campo	67
3.2.9 Condiciones del análisis cromatográfico	68
3.3 Resultados y discusión.....	70
3.4 Conclusiones	91
3.5 Bibliografía.....	92
4 APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN LA FRACCIÓN FINAL DE AIRE EXHALADO	97
4.1 Introducción	97
4.2 Experimental.....	99
4.2.1 Estudios en atmósfera controlada.....	99
4.2.2 Muestras de aire exhalado en trabajadores expuestos	102
4.2.3 Método SPME y análisis GC-MS y GC-FID.....	103
4.2.4 Comparación con otro procedimiento de toma de muestra de la fracción final de aire exhalado.....	106
4.3 Resultados y discusión.....	107
4.4 Conclusiones	120
4.5 Bibliografía.....	121
5 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE CETONAS (ACETONA, METILETILCETONA Y METILISOBUTILCETONA) Y TETRAHIDROFURANO EN ORINA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	125
5.1 Introducción	125
5.2 Experimental.....	128
5.2.1 Reactivos y preparación de patrones.....	128
5.2.2 Método SPME y condiciones del análisis cromatográfico.....	128
5.2.3 Condiciones del análisis mediante HS-GC-MS	130
5.2.4 Diseño experimental	131

5.2.5 Validación del método SPME.....	133
5.3 Resultados y discusión.....	134
5.3.1 Diseño factorial fraccionado para la identificación de los factores.....	134
5.3.2 Diseño compuesto central.....	137
5.3.3 Validación del método SPME.....	146
5.3.4 Estudio comparativo	152
5.4 Conclusiones	154
5.5 Bibliografía	154
6 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA – CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL MUESTREO Y DETERMINACIÓN DE ESTIRENO SIN METABOLIZAR EN ORINA	159
6.1 Introducción	159
6.2 Experimental	161
6.2.1 Reactivos y dispositivo de muestreo de orina	161
6.2.2 Preparación de los patrones de estireno.....	161
6.2.3 Procedimiento de muestreo de orina y extracción en fase sólida.....	162
6.2.4 Estudio de recuperación	164
6.2.4 Condiciones del análisis cromatográfico	166
6.2.5 Estudio de la estabilidad del estireno en el cartucho SPE.....	166
6.2.6 Estudio de campo.....	167
6.3 Resultados y discusión.....	168
6.3.1 Estudio de recuperación	168
6.3.2 Parámetros analíticos	175
6.3.3 Estudio de estabilidad de estireno	178
6.3.4 Estudio de campo.....	182
6.4 Conclusiones	183
6.5 Bibliografía	184
7 CONCLUSIONES.....	189

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

De entre los compuestos químicos industrialmente más importantes, los conocidos como compuestos orgánicos volátiles (VOC) forman un gran grupo de compuestos químicos con altos niveles de producción en todo el mundo y numerosas aplicaciones, tanto en el sector de la industria como en el de servicios. De acuerdo con la definición dada por la Comunidad Europea, VOC es todo compuesto orgánico que tenga a 20°C una presión de vapor de 0,01 kPa o superior, o que tenga una volatilidad equivalente en las condiciones particulares de uso, o lo que es lo mismo, cualquier compuesto orgánico que tenga un punto de ebullición inicial menor o igual a 250°C a dicha presión [1,2].

Este término abarca diferentes clases de sustancias químicas con distintas características fisicoquímicas y toxicológicas. Los vapores que desprenden los VOC son, en general, tóxicos para el sistema nervioso central, irritantes del tracto respiratorio, tóxicos hepáticos y pueden causar lesiones en los riñones. Algunos de estos compuestos químicos, como el benceno, o el tricloroetileno, son carcinógenos humano; y otros, como el estireno y el percloroetileno, aunque no están reconocidos en la legislación como tales, son sospechosos de serlo [3]. En cuanto a la exposición a corto plazo pueden causar irritación de los ojos y las vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, fatiga, pérdida de coordinación, reacciones alérgicas de la piel, náusea y trastornos de la memoria. El término VOC incluye una gran cantidad de tipos de sustancias, como los que se muestran en la Tabla 1.1.

Entre las principales categorías de actividades industriales que utilizan este tipo de compuestos se encuentran, entre otras, los procesos de recubrimiento, la limpieza en seco, la fabricación de calzado, la impregnación de fibras de madera, la fabricación de recubrimientos, barnices, tintas y adhesivos, la imprenta, la fabricación de productos farmacéuticos, la conversión de caucho natural o sintético, la limpieza de superficies, la laminación de madera y plástico, y el recubrimiento de bobinas y de alambres en bobinas.

Uno de los usos industriales más importantes de los VOC es como disolventes, entendiendo como disolvente orgánico: “todo compuesto orgánico volátil que se utilice solo o en combinación con otros agentes, sin sufrir ningún cambio químico, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, o se utilice como agente de limpieza para disolver la suciedad, o como disolvente, o como medio de dispersión,

o como modificador de la viscosidad, o como agente tensoactivo, o plastificante o conservador” [1].

Tabla 1.1. Tipos de sustancias químicas considerados VOC.

Tipo de sustancia	Ejemplo
hidrocarburos aromáticos	benceno tolueno xilenos etilbenceno estireno
hidrocarburos alifáticos	n-hexano
hidrocarburos clorados	diclorometano clorobenceno tetracloroetileno
alcoholes	metanol etanol
ésteres de los ácidos carboxílicos	acetato de etilo
cetonas	acetona metil etil cetona metil isobutil cetona
glicoléteres	éter monoetílico del etilenglicol
éteres	metil <i>terc</i> -butil éter tetrahidrofurano
amidas	dimetilformamida

Desde el punto de vista de la higiene industrial, un “agente químico” se define como “todo elemento o compuesto químico, por sí solo o mezclado, tal como se presenta en estado natural o es producido, utilizado o vertido, incluido el vertido como residuo, en una actividad laboral, se haya elaborado o no de modo intencional y se haya comercializado o no”. Se puede considerar a gran parte de los VOC como agentes químicos peligrosos coincidiendo con la definición que se recoge en el Real

Decreto 374/2001 [4], ya que debido a las propiedades fisicoquímicas, químicas o toxicológicas, a la forma en que se utiliza o se halla presente en el lugar de trabajo, y a que tienen asignados valores límite de exposición profesional, la mayoría de ellos pueden presentar un riesgo para la seguridad y salud de los trabajadores. Se entiende como riesgo “la posibilidad de que un trabajador sufra un determinado daño derivado de la exposición a agentes químicos”. El mencionado real decreto, define como peligro a “la capacidad intrínseca de un agente químico para causar daño” y considera como daños derivados del trabajo las enfermedades, patologías o lesiones sufridas con motivo u ocasión del trabajo” [5].

La presencia de los agentes químicos en el ambiente laboral implica, por tanto, un riesgo de que se produzcan alteraciones en el organismo que tengan como consecuencia la aparición de un daño biológico. Cuando haya una exposición y el tóxico penetre en el organismo, el daño producido dependerá de la toxicidad de la sustancia y de la dosis efectiva recibida.

El daño puede manifestarse de manera rápida o incluso inmediata tras el contacto (efecto agudo), o bien manifestarse a largo plazo, normalmente por exposición repetida a lo largo del tiempo (efecto crónico). Por otra parte, el daño puede manifestarse en el punto de contacto entre el agente químico y el organismo (piel, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal), en cuyo caso se habla de efecto local, o bien manifestarse, tras un proceso de absorción y distribución en el organismo, en puntos de éste independientes del lugar donde se produjo el contacto (efectos sistémicos) [6]. Del mismo modo también se puede hablar de efectos reversibles o irreversibles. Si se trata de efectos reversibles, el tejido afectado se recupera y vuelve a su estado normal cuando cesa la exposición. Cuando el efecto de la exposición a un agente químico es irreversible no tiene lugar la recuperación una vez que cesa la exposición. Tanto los efectos agudos como los crónicos pueden ser locales o sistémicos y a su vez pueden ser reversibles o irreversibles [7].

En general, para muchos de los agentes químicos, los efectos se presentan únicamente después de que se haya superado una determinada dosis, que se denomina “dosis umbral”. Las exposiciones a dosis por debajo de la umbral no presentan efectos porque actúan los mecanismos de defensa del organismo y las sustancias se metabolizan y/o excretan antes de causar daño. Sin embargo, en cualquier individuo, un aumento en la dosis por encima del nivel umbral dará como resultado efectos cada vez más severos.

1.1 Evaluación de la exposición laboral a compuestos orgánicos volátiles

Para asegurar que los riesgos para la salud de las personas estén totalmente controlados, la Ley de Prevención de Riesgos Laborales (Ley 31/1995, de 8 de noviembre) establece para el empresario la obligación de determinar la presencia de agentes químicos peligrosos en el lugar de trabajo, de eliminarlos y, cuando esto no sea posible, evaluar el riesgo al que puedan dar lugar. De esta forma, si los resultados de la evaluación indican que hay riesgo, será necesario aplicar medidas preventivas para que no haya efectos sobre la salud de los trabajadores.

La primera etapa del proceso de evaluación consiste en determinar la presencia de agentes químicos peligrosos en el lugar de trabajo, ya que esta circunstancia puede suponer un riesgo que es necesario evaluar.

Debido a las numerosas actividades industriales que utilizan VOC, su presencia en el ambiente de trabajo resulta ser muy habitual. Si además de estar presente en el lugar de trabajo se produce un contacto entre estos compuestos y el trabajador, normalmente por inhalación o por vía dérmica, tiene lugar una exposición a dichos compuestos. Por este motivo, se puede afirmar que la exposición a VOC es muy frecuente.

Para los compuestos volátiles la inhalación es una ruta de exposición destacada pero muchos de estos compuestos se pueden absorber también muy fácilmente a través de la piel [8]. Hay algunos agentes químicos para los cuales la absorción por vía dérmica, tanto en estado líquido como en fase de vapor, puede ser muy elevada, pudiendo ser esta vía de entrada de igual o mayor importancia incluso que la vía inhalatoria (por ejemplo, 2-metoxietanol, 2-etoxietanol y sus acetatos) [9]. Por esta razón los riesgos a evaluar serán principalmente el riesgo por inhalación y el riesgo por absorción a través de la piel. Los factores más significativos que habrá que tener en cuenta en el caso de riesgo por inhalación de VOC serán la concentración ambiental a la que está expuesto el trabajador, medida cerca de las vías respiratorias, y el tiempo diario de exposición. La dosis absorbida por el trabajador dependerá directamente de estos parámetros que se acaban de mencionar. No obstante, todos los factores que aumenten la concentración o el tiempo de exposición también tendrán que tenerse en cuenta en la evaluación.

El Real Decreto 374/2001 exige, salvo excepciones, que la evaluación de los riesgos derivados de la exposición por inhalación a un agente químico peligroso

incluya la medición de la concentración ambiental del contaminante y su comparación con el valor límite adecuado. La utilización de criterios ambientales ha sido la forma usada tradicionalmente para la evaluación del riesgo de exposición a contaminantes. Esto es, mediante el control ambiental se determina la concentración del agente químico en aire, lo que junto con el tiempo durante el cual el trabajador se encuentra inhalando el mismo, permite estimar la “dosis externa” recibida a lo largo de la jornada laboral.

Sin embargo, el conocimiento de la dosis absorbida realmente por el trabajador sería la más directamente relacionada con los efectos para su salud y permitiría una mejor valoración del riesgo. En este caso se trata del control biológico de la exposición y permite la estimación de la “dosis interna” mediante la medida de un biomarcador en las muestras biológicas tomadas al trabajador en un momento determinado.

1.2 Control ambiental de la exposición laboral

El control ambiental es una herramienta muy útil para la evaluación de la exposición, su objetivo es determinar la dosis externa. Esta determinación se realiza midiendo la concentración de los contaminantes en el aire cercano a las vías respiratorias del trabajador –que será el más parecido al que realmente entra al organismo mediante la inhalación-. Esta concentración, asociada al tiempo durante el cual el trabajador se encuentra inhalando este aire, será precisamente la dosis externa. Hay que tener en cuenta que el control ambiental solo considera la penetración del tóxico al organismo por vía respiratoria.

La base del control ambiental es, por tanto, la realización de mediciones o toma de muestras cuyos resultados permitan conocer la concentración a la que el trabajador ha estado expuesto durante su jornada laboral, es decir, la concentración media ponderada en el tiempo. Los objetivos que se pretenden son disponer de información para poder tomar decisiones sobre la necesidad de adoptar medidas preventivas adicionales a las existentes y, si esto es así, qué tipo de medidas son necesarias.

La obtención de un valor fiable de la concentración ambiental, que sea representativo de la exposición, requiere de la utilización de una estrategia de muestreo adecuada cuyo objetivo es conseguir que los resultados obtenidos el día o

días que se realizaron las mediciones sean extrapolables a otros días. Para ello, se estudia el número de muestras necesario y sus características en cuanto al tiempo durante el cual se tomará cada muestra, la duración del periodo de muestreo y el número de días de toma de muestra necesario. El resultado permitirá el cálculo de la probabilidad de que se supere el valor límite de una exposición ambiental.

En la Guía Técnica de Agentes Químicos [10] se indican criterios sobre las mediciones ambientales y la estrategia de muestreo para la evaluación de la exposición.

La toma de muestras debe ser de tipo personal, siempre que sea posible, obtenidas en la zona de respiración del trabajador, entendiendo como tal, la semiesfera de 0.3 m de radio que se extiende por delante de la cara, cuyo centro se localiza en el punto medio del segmento imaginario que une ambos oídos y cuya base está constituida por el plano que contiene dicho segmento, la parte más alta de la cabeza y la laringe [11]. Habrá que tener en cuenta también que el tiempo de referencia utilizado en la toma de muestra o en el cálculo de la concentración promediada en el tiempo deberá coincidir con el periodo de tiempo de referencia o período especificado de tiempo para el que está definido el valor límite con el que se vaya a comparar. El período de referencia para el límite de larga duración es habitualmente de 8 horas, y para el límite de corta duración, de 15 minutos [12]. En consecuencia, pueden definirse dos tipos de exposición. Uno es la exposición diaria (ED) que es la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador medida, o calculada de forma ponderada con respecto al tiempo, para la jornada real y referida a una jornada estándar de 8 horas diarias. El otro tipo de exposición es la exposición de corta duración (EC) que es la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador, medida o calculada para cualquier período de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral, excepto para aquellos agentes químicos para los que se especifique un período de referencia inferior, en la lista de Valores Límite.

1.2.1 Valores de referencia ambientales

Para completar la evaluación de la exposición a agentes químicos de los trabajadores, cuando se han realizado mediciones ambientales siguiendo una estrategia de muestreo adecuada, es necesaria la comparación de dicha exposición

con los criterios de valoración ambientales. En España estos criterios son los valores límite ambientales que se recogen en el "Documento sobre Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España" que revisa y publica anualmente el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [9].

La constitución por el INSHT en 1995 de un grupo de trabajo sobre Valores Límite de Exposición Profesional permitió la publicación de un primer documento en 1999, seguido por actualizaciones anuales para hacer frente, a medio plazo, a la obligación que la Directiva 98/24/CE del Consejo -relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo, y cuya transposición a la legislación española es el RD 374/2001- imponía a los Estados miembros de establecer límites de exposición profesional nacionales [13].

A nivel europeo, y como desarrollo de la Directiva 98/24/CE, se publicó en el año 2000 una primera lista de valores límite indicativos [14]. Posteriormente, se publicó una segunda lista en el año 2006 y una tercera en 2009 [15,16].

Para cada uno de los agentes químicos recogidos en esta lista los Estados miembros deben establecer un valor límite de exposición profesional nacional, determinándose su naturaleza de conformidad con la legislación y la práctica nacional. Así pues, estos valores límite de exposición profesional indicativos comunitarios se encuentran ya incorporados a los recogidos en el documento ya mencionado que publica el INSHT. A estos valores remite explícitamente el Real Decreto 374/2001 como valores de referencia para la evaluación y control de riesgos originados por la exposición de los trabajadores a los agentes químicos.

En este documento se considerarán como Límites de Exposición Profesional los Valores Límite Ambientales (VLA), que se definen como valores de referencia para las concentraciones de los agentes químicos en el aire, y representan condiciones a las cuales se cree, basándose en los conocimientos actuales, que la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos día tras día, durante toda su vida laboral, sin sufrir efectos adversos para su salud. Se refieren a la mayoría de los trabajadores y no a la totalidad puesto que, debido a la amplitud de las diferencias de respuesta existentes entre los individuos, basadas tanto en factores genéticos, fisiológicos, como en hábitos de vida, un pequeño porcentaje de trabajadores podría experimentar molestias a concentraciones inferiores a los VLA, e incluso resultar afectados más gravemente, sea por empeoramiento de una condición previa o desarrollando una patología laboral.

Dichos valores se establecen teniendo en cuenta la información disponible, procedente de la similitud físico-química de los agentes químicos, de estudios *in vitro*, de los estudios de experimentación animal y humana, de los estudios epidemiológicos y de la experiencia industrial.

Los VLA sirven exclusivamente para la evaluación y el control de los riesgos por inhalación de los agentes químicos incluidos en la lista de valores. No obstante, cuando uno de estos agentes se puede absorber por vía cutánea, sea por la manipulación directa (sólido, líquido) del mismo, sea a través del contacto de los gases, vapores y nieblas con las partes desprotegidas de la piel y cuya aportación puede resultar significativa al contenido corporal total del trabajador, la medición de la concentración ambiental puede no ser suficiente para cuantificar la exposición global por lo que resulta particularmente importante la utilización del control biológico, del que se hablará más adelante. En este caso los agentes aparecen señalados en la lista con la notación “vía dérmica” que advierte, por una parte, de que la medición de la concentración ambiental puede no ser suficiente para cuantificar la exposición global y, por otra, de la necesidad de adoptar medidas para prevenir la absorción dérmica. En estas circunstancias, la utilización del control biológico es imprescindible para poder cuantificar la cantidad global absorbida de contaminante.

Se consideran dos categorías de VLA. Una es el Valor Límite Ambiental-Exposición Diaria (VLA-ED), que es el valor de referencia para la ED definida anteriormente. De esta manera los VLA-ED representan condiciones a las cuales se cree, basándose en los conocimientos actuales, que la mayoría de los trabajadores pueden estar expuestos ocho horas diarias y 40 horas semanales durante toda su vida laboral, sin sufrir efectos adversos para su salud. Estos valores se adoptan para los agentes químicos cuyos principales efectos tóxicos son de naturaleza crónica.

La otra categoría de VLA es el Valor Límite Ambiental-Exposición de Corta Duración (VLA-EC) que es el valor de referencia para la EC y que no debe ser superado por ninguna EC a lo largo de la jornada laboral. A los agentes químicos de efectos principalmente agudos como, por ejemplo, los gases irritantes, se les asigna para su valoración un VLA-EC.

Para aquellos agentes químicos que tienen efectos agudos reconocidos pero cuyos principales efectos tóxicos son de naturaleza crónica, el VLA-EC constituye un complemento del VLA-ED y, por tanto, la exposición a estos agentes habrá de valorarse en relación con ambos límites.

Para muchos agentes químicos que tienen asignado un VLA-ED, no se dispone de un VLA-EC. Sin embargo es necesario controlar las fluctuaciones de la exposición por encima del VLA-ED, aun cuando este valor se encuentre dentro de los límites recomendados. En estos casos se aplican los límites de desviación que se establecen mediante consideraciones de carácter estadístico, a través del estudio de la variabilidad observada en gran número de mediciones, para determinar las exposiciones de corta duración en los procesos industriales reales.

Las desviaciones en los niveles de exposición de los trabajadores podrán ser superiores al valor $3 \times \text{VLA-ED}$ durante no más de un total de 30 minutos en una jornada de trabajo, no debiendo sobrepasar bajo ninguna circunstancia el valor $5 \times \text{VLA-ED}$. Si se mantienen las desviaciones de la exposición dentro de los límites establecidos, se considerará que la exposición está controlada; en caso contrario, será necesario implantar medidas correctoras para mejorar el control.

En general, la concentración media de un agente químico en la zona de respiración del trabajador no debe superar su valor VLA-ED en ninguna jornada de trabajo. No obstante, si se trata de un agente químico de largo período de inducción, es decir, capaz de producir efectos adversos para la salud sólo tras exposiciones repetidas a lo largo de meses o años, y además tienen lugar variaciones entre las ED de distintas jornadas debidas a diferencias en las situaciones de exposición, entonces se acepta el empleo de una base semanal de valoración en lugar de diaria.

También existen límites de exposición ambiental propuestos por asociaciones internacionales de reconocido prestigio tales como la American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) y la Deutsche Forschungsgemeinschaft Commision (DFG) que publican periódicamente los valores de referencia ambiental TLV y MAK, respectivamente [17,18].

Los valores TLV (Threshold Limit Values) o Valores Límite Umbral, propuestos por la ACGIH, son unos límites recomendados y representan los límites máximos de concentración permitidos de una sustancia en el aire en función del tiempo de exposición. Los trabajadores pueden exponerse repetidamente a la acción de dichas concentraciones, sin sufrir ningún daño para su salud.

Dada la elevada variación en la susceptibilidad individual, es posible que un pequeño porcentaje de trabajadores experimente malestar ante algunas concentraciones iguales o inferiores al límite umbral, mientras que un porcentaje

menor puede resultar afectado más seriamente por la agravación de una condición que ya existía anteriormente, o por la aparición de una enfermedad profesional.

Entre sus recomendaciones de uso, se tiene en cuenta la posibilidad de que algunas personas puedan presentar una respuesta inesperada adversa a algunos compuestos químicos de uso industrial, debido a factores genéticos, edad, hábitos personales (tabaco, alcohol y el consumo de otras drogas), medicación o exposiciones anteriores que les han sensibilizado. Puede que estos trabajadores no estén adecuadamente protegidos ante los efectos adversos que para su salud pueden ejercer ciertos compuestos químicos a concentraciones próximas o por debajo del TLV, por lo que se debe evaluar, en estos casos, la protección adicional que requieren estos trabajadores.

Se han establecido valores TLV para la mayoría de sustancias químicas presentes en el medio ambiente de trabajo.

Debido a que las sustancias químicas pueden producir distintos efectos sobre las personas expuestas, se definen tres tipos de TLVs. Uno es el TLV-TWA (Threshold Limit Value – Time Weighted Average) (Valor Límite Umbral – Media Ponderada en el Tiempo) que representa la concentración media ponderada en el tiempo, para una jornada normal de trabajo de 8 horas y una semana laboral de 40 horas, a la que pueden estar expuestos casi todos los trabajadores repetidamente, día tras día, sin presentar efectos adversos.

Existe un valor de concentración a la que pueden estar expuestos los trabajadores de manera continua durante un corto espacio de tiempo sin sufrir irritación, daños crónicos o irreversibles en los tejidos, o narcosis en grado suficiente para aumentar la probabilidad de lesiones accidentales, perjudicar la auto recuperación o reducir sustancialmente la eficacia en el trabajo, y siempre que no se sobrepase el TLV-TWA diario. A esa concentración se le denomina TLV-STEL (Threshold Limit Value – Short Term Exposure Limit) (Valor Límite Umbral – Límite de Exposición de Corta Duración), y se define como la exposición media ponderada en un tiempo de 15 minutos, que no se debe sobrepasar en ningún momento de la jornada laboral, aún cuando la media ponderada en el tiempo que corresponda a las ocho horas sea inferior al TLV. Las exposiciones superiores al TLV-TWA hasta el valor STEL no deben tener una duración superior a 15 minutos, ni repetirse más de cuatro veces al día, y debe haber, por lo menos, un periodo de 60 minutos entre exposiciones sucesivas de este rango.

Existe un tercer tipo de TLV que recibe el nombre de TLV-C (Threshold Limit Value – Ceiling) (Valor Límite Umbral – Techo) y que es la concentración que no se debe sobrepasar en ningún momento durante la exposición en el trabajo.

Los valores MAK (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration) corresponden a valores de concentración máxima de la sustancia química (sea gas, vapor o materia particulada) en áreas de trabajo para los que, de acuerdo con los conocimientos actuales, no se producirán generalmente alteraciones de la salud de los trabajadores ni se causarán molestias indebidas. Bajo estas condiciones, la exposición puede repetirse o mantenerse durante períodos diarios de 8 horas, que constituyan una semana de trabajo promedio de 40 horas.

Los valores MAK son, por regla general, concentraciones promediadas para toda la jornada de trabajo. Estos valores promediados para 8 horas se complementan con limitaciones para los picos de exposición que se establecen mediante una clasificación de las diferentes sustancias en seis categorías, cada una de las cuales está sujeta a un tipo concreto de limitación para períodos cortos de exposición a concentraciones por encima del valor MAK asignado.

Dichos valores se establecen a partir de los conocimientos sobre los efectos para la salud de los agentes químicos; cuando es posible, también se tienen en cuenta los aspectos prácticos de los procesos industriales y las pautas de exposición resultantes; los criterios científicos para la prevención de los efectos adversos sobre la salud son decisivos, no así los técnicos o la viabilidad económica.

Tanto los valores MAK, como los TLV y los VLA, se revisan anualmente.

1.3 Control biológico de la exposición laboral

Como se ha mencionado anteriormente, la dosis de los contaminantes realmente absorbida por el trabajador sería la más directamente relacionada con los efectos para su salud y permitiría una mejor valoración del riesgo. Para estimar esta “dosis interna” se usa el control biológico de la exposición, que se define como la medida y evaluación continua o repetida de los agentes químicos, o de sus metabolitos, o de cambios bioquímicos originados por ellos en fluidos biológicos, secreciones, excreciones, aire exhalado, o tejidos, o cualquier combinación de estos para evaluar la exposición y el riesgo para la salud del trabajador mediante su

comparación con valores de referencia adecuados [19]. Se trata pues, de un seguimiento de la exposición midiendo la concentración de los contaminantes o de sus metabolitos, o sus efectos en el organismo, en determinados medios biológicos de los trabajadores expuestos. Estas mediciones deben ser periódicas de forma que permitan analizar la tendencia que siguen y puedan detectarse cambios antes de que se presenten efectos clínicamente relevantes.

El control biológico y el ambiental no son excluyentes sino complementarios, si bien hay circunstancias en que la utilización del control biológico puede ser imprescindible para poder cuantificar la cantidad global absorbida de contaminante. En comparación con el control ambiental, el control biológico tiene una relación mucho más directa con la cantidad total de sustancia tóxica absorbida a través de las distintas vías simultáneas de entrada. También permite reflejar la influencia de los hábitos higiénicos personales, pone también de manifiesto aspectos concretos de la exposición –como variaciones individuales en la velocidad de absorción de un agente químico o el efecto de la carga de trabajo del individuo expuesto- y permite estimar otras fuentes distintas a las de origen laboral. Así mismo, resulta de gran utilidad para comprobar la eficacia de los equipos de protección personal.

El indicador o marcador biológico es un parámetro apropiado en un medio biológico del trabajador, que se mide en un momento determinado, y está asociado, directa o indirectamente, con la exposición global, es decir, por todas las vías de entrada (respiratoria, digestiva y dérmica), a un agente químico [9].

Como especímenes o medios biológicos los que más se utilizan son la orina, la sangre y el aire exhalado. Según cuál sea el parámetro, el medio en que se mida y el momento de la toma de muestra, la medida puede indicar la intensidad de una exposición reciente, la exposición promedio diaria o la cantidad total del agente acumulada en el organismo, es decir, la carga corporal total. De este modo se consideran dos tipos de indicadores biológicos (IB). Uno es el IB de dosis, que es un parámetro que mide la concentración del agente químico o de alguno de sus metabolitos en un medio biológico del trabajador expuesto. El otro es el IB de efecto, parámetro que puede identificar alteraciones bioquímicas reversibles, inducidas de modo característico por el agente químico al que está expuesto el trabajador.

Teóricamente, para el empleo del control biológico en una población expuesta se necesita tener un profundo conocimiento previo de una serie de aspectos toxicológicos, del metabolismo y de la toxicodinámica referente al compuesto y al parámetro biológico que se va a utilizar, así como de la relación de dicho parámetro

con las concentraciones en el ambiente [20,21]. En la práctica, para que sean válidos los resultados obtenidos mediante el control biológico es imprescindible conocer las condiciones de toma de muestra, el método analítico a utilizar, el tipo de muestra a determinar y respecto a qué valor de referencia se va a comparar. Todos estos aspectos están relacionados entre sí y unos condicionan a los otros, por ejemplo, la utilización de un determinado valor límite condiciona el tipo de muestra, el espécimen y la estrategia de muestreo, por tanto es necesario ajustar todo el proceso a fin de obtener resultados comparables.

En muchos casos, estas determinaciones efectuadas en la sangre, la orina o el aire exhalado del trabajador o grupo de trabajadores son mucho más representativas de la exposición a la que realmente se encuentran sometidos que las efectuadas en el aire del lugar de trabajo.

1.3.1 Especímenes biológicos

Los especímenes o medios biológicos, donde la determinación de los indicadores biológicos es posible, dependen tanto de las vías de entrada, distribución y eliminación, como de la naturaleza química del compuesto. La mayoría de estas determinaciones tienen lugar en sangre, orina o aire exhalado.

La sangre es el fluido biológico encargado del transporte y la distribución de los compuestos químicos en el cuerpo, por tanto la mayoría de las sustancias activas o sus metabolitos se pueden encontrar en este medio. En general, en sangre se determinan la mayoría de los compuestos inorgánicos y los compuestos orgánicos que tengan bajas tasas de biotransformación y una vida media suficientemente larga, es decir, que permanezcan durante largo tiempo en el organismo. Asimismo, este medio es adecuado para la determinación de sustancias unidas a macromoléculas, como la hemoglobina [22]. En general, la determinación de VOC sin modificar en sangre es específica ya que no es probable encontrarlos en este medio si no ha habido una exposición previa.

Unas de las desventajas más importantes de la determinación en sangre consisten en que su recogida constituye una técnica invasiva que sólo puede realizar personal sanitario cualificado, y que las muestras se pueden deteriorar en su transporte y/o almacenamiento. En muchos casos, la concentración de disolventes

volátiles en sangre coincide con la del aire alveolar, siendo esta última técnica no invasiva y por consiguiente, mejor aceptada por los individuos expuestos.

La orina es fácil de recoger, se pueden utilizar grandes volúmenes de muestra y es también una técnica no invasiva. En orina se determinan compuestos inorgánicos, principalmente los metales, y compuestos orgánicos o sus metabolitos. Para compuestos con vida media corta o sujetos a fluctuaciones ambientales, las determinaciones en orina realizadas en muestras recogidas al final de la jornada, suelen reflejar mejor la dosis interna que las muestras puntuales en sangre o aire exhalado, puesto que la concentración del compuesto en orina generalmente refleja el nivel medio del xenobiótico en plasma durante el periodo de acumulación en la vejiga [22]. Las determinaciones realizadas en orina de 24 horas son más representativas ya que proporcionarían una información más exacta sobre la eliminación del xenobiótico que las muestras puntuales, sin embargo en el entorno laboral no es fácil la obtención de este tipo de muestras.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la medida de la concentración de un compuesto en este medio a partir de muestras puntuales puede verse afectada por la variabilidad en la producción de orina, debido a factores como la ingestión de líquidos, la temperatura excesiva, la carga de trabajo, el consumo de medicamentos, etc. que pueden producir efectos de concentración o dilución de la orina.

Con el fin de normalizar los resultados obtenidos, es necesario corregirlos, refiriéndolos a la concentración de alguna sustancia con mecanismo de excreción renal similar al del compuesto de interés y cuya eliminación se mantenga razonablemente constante a lo largo del tiempo.

En algunas ocasiones, los resultados de los indicadores se refieren a la concentración de creatinina (sustancia que se elimina por filtración glomerular, como la mayoría de los contaminantes y sus metabolitos) medida en la misma muestra, expresándose los resultados en peso del indicador por unidad de peso de creatinina. Cuando éstos sean excretados por otro mecanismo, como la difusión tubular renal, no se realizará esta corrección, expresándose los resultados directamente en términos de concentración.

Con objeto de excluir las muestras de orina que no son útiles para el control biológico, se rechazarán las muy diluidas (densidad < 1,010 g/ml o creatinina < 0,3 g/l) y las muy concentradas (densidad > 1,030 g/ml o creatinina > 3,0 g/l), debiendo repetirse en estos casos la toma de muestra.

Como se ha mencionado, y a diferencia de otro tipo de muestras biológicas, la orina resulta fácil de recoger, por lo que no requiere personal cualificado, se pueden recoger grandes volúmenes de muestra y es también una técnica no invasiva y, por este motivo, bien aceptada por los trabajadores. Asimismo, presenta la ventaja de una menor complejidad de la matriz en comparación con la de la sangre.

Gracias a las posibilidades que ofrecen las nuevas técnicas analíticas para la determinación de compuestos a niveles traza, se ha demostrado que la excreción urinaria de compuestos químicos sin metabolizar puede ser un indicador fiable para el control biológico de la exposición a dichos contaminantes de personas laboralmente expuestas. Además, la determinación de una sustancia sin biotransformar presenta mayor especificidad y menor variabilidad entre individuos que la determinación de sus metabolitos en orina, siendo considerados en algunos casos como los más apropiados [23-25].

Una desventaja de este tipo de análisis podría ser la pérdida de estos analitos sin metabolizar en la fase preanalítica. Por este motivo es importante el desarrollo de técnicas de toma de muestras y métodos de análisis que reduzcan la manipulación de la muestra y eviten estas pérdidas.

Las determinaciones en aire exhalado constituyen un método no invasivo y, por tanto, muy bien aceptado por la población, sin embargo están limitadas a la exposición a compuestos orgánicos volátiles. El marcador biológico suele ser el propio compuesto sin metabolizar, por lo que las determinaciones en este medio son muy específicas, ya que es prácticamente imposible la presencia de interferencias de carácter endógeno [22].

El aire exhalado es una mezcla gaseosa cuya composición difiere de la del aire que ha entrado en los pulmones. Es una mezcla del aire que se encuentra en los alveolos con el aire que se encuentra ocupando las vías respiratorias al terminar la inspiración. El aire que se encuentra en el volumen muerto del sistema respiratorio tiene prácticamente las mismas características que el aire ambiental. Por ello el volumen total de aire exhalado tiene una composición más parecida al aire ambiental que el propio aire alveolar [20]. Se debe distinguir, por tanto, entre “aire exhalado mezclado”, que es la mezcla que se acaba de describir, y el “aire exhalado final”, que se obtiene al final de una exhalación y refleja principalmente la fracción alveolar. No es recomendable el uso del aire exhalado mezclado con fines cuantitativos en el control biológico ya que contiene una proporción de aire alveolar diluida en aire procedente

del volumen muerto. La utilización del aire alveolar ofrece mayores ventajas para ser utilizado como un indicador biológico cuantitativo.

La concentración del contaminante en el aire exhalado final suministra una información más precisa del nivel del compuesto en sangre, pero cuando se quiere obtener esta fracción es preciso utilizar y validar los dispositivos de toma de muestra empleados [26].

La determinación de VOC en aire exhalado es, como se ha mencionado, un método no invasivo y con una matriz de muestra más simple que la de otros especímenes biológicos como la orina y la sangre. Otras ventajas de la utilización de muestras de aire exhalado son que se determina directamente el propio compuesto químico sin biotransformar, sin que esta venga afectada por factores individuales de tipo metabólico, por lo que las determinaciones en este medio son muy específicas, y el analito aparece rápidamente en el aire exhalado.

El momento del muestreo en relación con el periodo de la exposición es crítico y en función del mismo podemos obtener información relacionada con la exposición reciente o con la acumulación diaria o semanal. Por estos motivos, es necesario que la toma de muestra sea llevada a cabo de una forma muy estricta para que los resultados sean reproducibles.

A pesar de las ventajas mencionadas, el uso del análisis del aire exhalado como espécimen biológico ha ido disminuyendo con el tiempo. Prácticamente en la actualidad no se utiliza como método rutinario para el control biológico de la exposición laboral. En el documento sobre valores límite profesionales en España, publicado por el INSHT [9], de 64 VLB propuestos para 46 sustancias químicas, tan sólo 2 corresponden al aire exhalado. Este hecho es debido, fundamentalmente, a la falta de normalización de los sistemas de toma de muestra, por lo que resultaría de gran utilidad el desarrollo de nuevas técnicas que faciliten la toma de muestra, el transporte y la conservación permitiendo un uso rutinario de este espécimen para el control biológico de la exposición.

1.3.2 Valores de referencia biológicos

Los valores límite biológicos (VLB) recogidos en los Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España del INSHT, son los valores de

referencia para los indicadores biológicos asociados a la exposición global de los agentes químicos [9]. Los VLB son aplicables para exposiciones profesionales de ocho horas diarias durante cinco días a la semana. La extensión de los VLB a períodos distintos al de referencia ha de hacerse considerando los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos del agente en particular.

Las bases científicas para establecer los VLB pueden derivarse de dos tipos de estudios, los que relacionan la intensidad de la exposición con el nivel de un parámetro biológico (indicadores biológicos de dosis), y los que relacionan el nivel de un parámetro biológico con efectos sobre la salud (indicadores biológicos de efecto). Hasta el momento, el número de indicadores de efecto que se utilizan es muy limitado (por ejemplo, plomo en sangre, actividad de la colinesterasa eritrocitaria, metahemoglobina). Por lo que puede decirse que, en general, los VLB representan los niveles más probables de los indicadores biológicos en trabajadores sanos sometidos a una exposición global a agentes químicos, equivalente, en términos de dosis absorbida, a una exposición exclusivamente por inhalación del orden del VLA-ED. La excepción a esta regla la constituyen algunos agentes para los que los VLA asignados protegen contra efectos agudos. En estos casos, los VLB pueden representar dosis absorbidas superiores a las que se derivarían de una exposición por inhalación al VLA.

El control biológico debe considerarse complementario del control ambiental y, por tanto, ha de llevarse a cabo cuando ofrezca ventajas sobre el uso independiente de este último, por ejemplo, cuando intervengan factores individuales como el esfuerzo físico, malos hábitos de higiene, procedimiento de trabajo inadecuado, trabajadores especialmente sensibles. El control biológico puede utilizarse para completar la valoración ambiental, cuando se producen exposiciones variadas e intermitentes, exposición simultánea a varios agentes, para comprobar la eficacia de los equipos de protección individual o para detectar una posible absorción dérmica y/o gastrointestinal. Hay que señalar, sin embargo, que cuando la aportación por la vía dérmica puede resultar significativa la utilización del control biológico es imprescindible para poder cuantificar la cantidad global absorbida de contaminante.

Al igual que ocurre con los valores de referencia ambientales, las dos instituciones internacionales más relevantes que publican anualmente una lista de valores límite biológicos son la ACGIH, que publica Biological Exposure Indices (BEI) y la DFG para la investigación de los daños derivados de la exposición a los compuestos químicos en el trabajo, que publica Biological Tolerance Values (BAT) [17,18].

Los BEI son valores de referencia para la evaluación de los riesgos potenciales para la salud y representan los niveles medios de los determinantes biológicos que se corresponden con los determinados en especímenes biológicos de trabajadores, expuestos por vía inhalatoria a una concentración ambiental del contaminante equivalente a su TLV. Los BEI se proponen como guía para la evaluación del riesgo potencial para la salud en la práctica de la higiene industrial, generado por exposiciones de 8 horas durante 5 días a la semana.

Tal como se ha indicado, la forma de obtener los VLB es similar a la de los BEI, se trata por tanto de valores de referencia, no de valores límite en el mismo sentido en que lo son los ambientales. Por tanto, no indican una distinción definida entre las exposiciones de riesgo o no riesgo y no están basados en concentraciones observadas en una población. Debido a la variabilidad biológica es posible que las medidas individuales para un determinado sujeto excedan los VLB, o BEI sin que haya un incremento de riesgo para su salud. Estos valores de referencia no están concebidos para ser utilizados como medida de los efectos adversos. Sin embargo, si las determinaciones biológicas efectuadas repetidamente en un mismo individuo superan estos valores, o si lo supera la mayoría de las determinaciones biológicas de un grupo de trabajadores expuestos al mismo ambiente laboral, se deberán investigar las causas de los valores elevados y adoptar las medidas oportunas para reducir la exposición [20].

De todos modos, incluso en el caso de una superación de carácter puntual, debe ponerse en marcha una investigación con el objetivo de encontrar una explicación plausible para esa circunstancia y actuar en consecuencia o, en su defecto, descartar la existencia de factores causales vinculados al desempeño del puesto de trabajo. Entretanto se alcanza una conclusión al respecto y sin perjuicio de lo que establezcan disposiciones específicas, se deberían adoptar medidas para reducir la exposición del trabajador afectado. Al margen de esta consideración individual de los resultados, el agrupamiento de los datos correspondientes a los trabajadores de un grupo homogéneo con respecto a la exposición permitirá obtener información sobre el grado de eficacia de las medidas de protección y prevención adoptadas.

Desde que se publicaron en 1981, los valores BAT tuvieron un concepto distinto, a medio camino entre los BEI y los valores biológicos basados en el efecto para la salud. Los valores BAT se definieron como la máxima cantidad permisible del compuesto químico, sus metabolitos o la máxima desviación de los parámetros

biológicos normales inducida por una sustancia en personas expuestas. Los límites biológicos obtenidos por otras organizaciones (por ejemplo, ACGIH) se entienden como valores medios que pueden sobrepasarse individualmente, mientras que los valores BAT se definieron como valores “techo” con el fin de proteger la salud de los trabajadores [18]. En consecuencia, se espera que los valores BAT sean superiores a los BEI.

Actualmente la DFG ha modificado esta definición con objeto de armonizar mejor los valores con los de otras organizaciones, estableciendo que los valores BAT describen la concentración de una sustancia química, o de sus metabolitos o de un indicador de su efecto en un medio biológico adecuado derivado del criterio médico y toxicológico, a la cual la salud de un trabajador no se ve normalmente afectada, incluso después de exposiciones repetidas o de larga duración. Los valores BAT se basan en la relación entre la exposición externa y la interna o entre la exposición interna y el efecto de la sustancia causado por tal exposición. En este caso, la obtención de estos valores se basa en la media de las exposiciones internas [27].

Se supera el BAT si la concentración media del parámetro en una persona está por encima del BAT después de varias mediciones. Si el BAT se supera sólo una vez, no debe deducirse necesariamente un efecto adverso para la salud.

1.4 Métodos analíticos para el control ambiental y biológico

1.4.1 Medida de la concentración ambiental

Atendiendo a la duración del experimento de medida de la concentración ambiental es habitual distinguir entre mediciones puntuales, de muy corta duración, y promediadas, de duración prolongada.

En muchos casos las mediciones puntuales se realizan con instrumentos de lectura directa, mientras que las mediciones promediadas se llevan a cabo con sistemas de toma de muestra para un posterior análisis en el laboratorio.

Los instrumentos de lectura directa están preparados para indicar de forma inmediata el resultado de la medida de la concentración ambiental. Para la

determinación directa de la concentración ambiental de VOC existen en el mercado instrumentos colorimétricos y monitores de gases.

Los instrumentos colorimétricos se basan en el cambio de color que sufre un reactivo específico al reaccionar con un contaminante determinado. Los más utilizados son los tubos indicadores con reactivo sólido (tubos colorimétricos) acoplados a bombas de aspiración manual.

El dispositivo típico de un monitor de gases es un elemento sensor que genera una señal eléctrica proporcional a la concentración en aire del contaminante a medir. La señal se manipula por el instrumento de forma digital o analógica hasta convertirla en una indicación numérica en la pantalla. Los principios físicos para la detección cuantitativa en los que se basan las mediciones efectuadas con este tipo de aparatos son principalmente eléctricos, térmicos, electromagnéticos o quimielectromagnéticos. Su utilización exige calibraciones periódicas por medio de atmósferas o mezclas de gases de composición controlada. Existen monitores portátiles que se pueden utilizar como medidores personales, que permiten la lectura de las concentraciones promedio al final de la jornada laboral.

Los sistemas de toma de muestra ambientales, que se explican a continuación, pueden ser activos o pasivos.

1.4.1.1 Muestreo activo

Para el control ambiental, el muestreo activo es la técnica mayoritariamente utilizada por los métodos publicados por distintas organizaciones como OSHA, NIOSH, American Society for Testing and Materials (ASTM) y el INSHT. Está basado en la captación de los contaminantes presentes en el ambiente, utilizando para ello una bomba de aspiración que fuerza el paso de aire contaminado a través de un dispositivo de retención apropiado, como puede ser, tubos adsorbentes, filtros tratados o “impingers” que contengan un medio líquido. Para esta técnica de muestreo es un factor clave la calibración del caudal de la bomba de aspiración, que permita la determinación exacta del volumen de aire muestreado. Con el fin de asegurar que el caudal de la bomba se mantiene constante durante la toma de muestra, es necesario que se calibre antes y se verifique después de la toma de muestra. En la norma UNE-EN 1232 se especifican los requisitos que deben cumplir las bombas para muestreo personal de agentes químicos [28].

Para la captación de vapores es habitual que se utilicen tubos rellenos de material adsorbente (carbón activo, tenax, gel de sílice, zeolita o polímeros). La concentración en el aire se puede obtener de la siguiente fórmula:

$$C = \frac{m}{Q \times t} \quad 1.1$$

La masa, m , recogida en el adsorbente es proporcional a la concentración, C , y depende solamente del tiempo de muestreo, t , y del caudal de aspiración, Q , de acuerdo con la Ecuación 1.1. La concentración obtenida es la concentración promedio durante el tiempo en el que se ha recogido la muestra. Los requisitos que deben cumplir los tubos adsorbentes para la determinación de gases y vapores captados mediante bombeo se encuentran recogidos en la norma UNE-EN 1076 [29].

El hecho de que la mayoría de los métodos publicados por INSHT, OSHA y NIOSH estén basados en la utilización de técnicas de muestreo activo, trae consigo que exista mucha información que facilita su utilización. Sin embargo, también presenta una serie de desventajas como son la incomodidad para el trabajador que tiene que transportar la bomba, el tiempo empleado y los posibles errores en la calibración previa y la verificación posterior de la bomba, así como el hecho de que la batería con el paso del tiempo sea incapaz de mantener constante el caudal durante la toma de muestra y sean necesarias calibraciones más frecuentes.

1.4.1.2 Muestreo pasivo

Con posterioridad al muestreo activo, se desarrollaron métodos de muestreo pasivo. Un muestreador pasivo o difusivo es un dispositivo capaz de captar contaminantes gaseosos de la atmósfera a una velocidad controlada por un proceso físico, como es la difusión a través de una capa de aire estática o la permeación a través de una membrana, pero que no implica el movimiento activo del aire a través del muestreador [30]. La primera vez que se describió un muestreador difusivo aplicado al análisis cuantitativo fue en 1973 por Palmes y Gunnison [31]. Los muestreadores difusivos se basan en el movimiento de las moléculas del contaminante hacia el medio de retención debido a un gradiente de concentraciones. Los muestreadores pasivos consisten en una barrera y un adsorbente. La barrera generalmente es de uno de los dos tipos siguientes: una capa estática del medio que lo rodea (muestreadores tipo difusión) o una membrana polimérica (muestreadores

tipo permeación) [32]. El transporte neto a través de ella tiene lugar principalmente debido a la difusión molecular pudiendo aplicarse la ley de Fick. En la Figura 1.1 se representa esquemáticamente un elemento de difusión sencillo que consiste en un tubo conectado a un pequeño recipiente que contiene el lecho adsorbente. Cuando este elemento se expone a un ambiente contaminado de concentración ambiental C_a , se genera un gradiente de concentraciones entre los puntos I y II. En I, la concentración en aire del contaminante sería la concentración ambiental C_a , y en II, esta concentración se puede considerar nula, puesto que las moléculas que llegan a la interfase aire-adsorbente, quedarán inmediatamente fijadas al adsorbente.

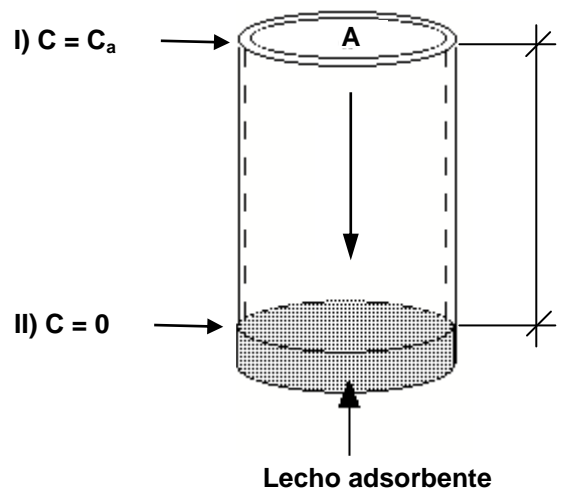


Figura 1.1. Esquema de un elemento sencillo de captación por difusión.

La diferencia de concentraciones entre los puntos I y II genera un flujo molecular que tiende a igualar las concentraciones entre ambos puntos y que será continuo si se mantiene constante el gradiente. En este caso, si la concentración ambiental se mantiene constante, también se puede considerar constante el gradiente, puesto que la pequeña masa de contaminante difundida no va a modificar su concentración ambiental y la concentración en la interfase aire-adsorbente será nula mientras no se sature el adsorbente.

La primera Ley de Fick, aplicada al diseño de la Figura 1.1, permite determinar teóricamente y en condiciones estacionarias ese flujo, mediante la expresión simplificada:

$$q_d = D_a \cdot \frac{A}{l} \cdot C_a \quad 1.2$$

donde:

q_d es el flujo másico del componente que difunde (ng/min),

D_a es el coeficiente de difusión (cm^2/min),

l es la longitud de difusión (cm),

A es la sección de difusión (cm^2) y

C_a es la concentración ambiental (mg/m^3).

Básicamente el empleo de los muestreadores difusivos requiere conocer el coeficiente de difusión, D_a , que es característico para cada compuesto. El coeficiente de difusión de una especie química puede determinarse de forma experimental o teórica.

La sección y longitud de difusión (A y l en la Ecuación 1.2) son datos característicos de la geometría del muestreador.

El flujo másico del componente puede expresarse también como

$$q_d = \frac{m_a}{t} \quad 1.3$$

donde m_a representa la masa retenida del agente químico durante el periodo de muestreo, t .

Igualando las Ecuaciones 1.2 y 1.3 se obtiene la expresión:

$$\frac{m_a}{t} = D_a \cdot \frac{A}{l} \cdot C_a \quad 1.4$$

a partir de la cual se despeja la concentración ambiental de la sustancia captada, obteniéndose la expresión:

$$C_a = \frac{m_a}{t \cdot D_a \cdot \frac{A}{l}} \quad 1.5$$

Los términos D_a , A y l , que son constantes para cada contaminante y cada muestreador, pueden agruparse en:

$$U = D_a \cdot \frac{A}{l} \quad 1.6$$

El término U tiene dimensiones de flujo volumétrico y recibe el nombre de velocidad de captación por difusión “sampling rate” o caudal de difusión.

La concentración ambiental de un contaminante podrá determinarse, conociendo la masa recogida por el muestreador, el tiempo durante el cual se ha recogido dicha masa y el término U , tal y como expresa la ecuación siguiente:

$$C_a = \frac{m_a}{t \cdot U} \quad 1.7$$

Según la Ecuación 1.6 la velocidad de captación por difusión (U) depende de las características geométricas del muestreador (A/l) y del coeficiente de difusión del compuesto en aire (D_a). El término D_a y la geometría del muestreador se pueden utilizar para determinar una U teórica. Sin embargo, esta U puede variar con las condiciones ambientales ya que la difusión de los analitos varía dependiendo de factores como la temperatura y la concentración. Para la determinación experimental de la velocidad de captación por difusión (U) es preciso conocer qué variables le afectan y en qué medida lo hacen. Por tanto, se debe someter al muestreador pasivo objeto de estudio a un proceso de validación en el que se determina el valor de la velocidad de captación por difusión para cada contaminante, bajo una variedad de condiciones ambientales (concentración del contaminante, temperatura, duración del muestreo, velocidad del aire). Se evalúan aspectos como la eficacia de desorción, el tiempo de almacenamiento o la difusión reversa. Este último fenómeno puede suceder cuando después de un tiempo de muestreo, la concentración del contaminante es mayor en la superficie del adsorbente o absorbente que en el ambiente, por lo que la difusión podría producirse en dirección contraria. Para evaluar la influencia de las condiciones ambientales y los aspectos mencionados sobre el valor de U existen distintos protocolos de validación para muestreadores pasivos [33-39]. Con el objetivo de llevar a cabo la validación de los muestreadores pasivos es necesario un sistema de generación de atmósferas de concentración conocida que sea capaz de abarcar un

amplio rango de concentraciones, temperaturas, humedades relativas y velocidades del aire.

Se han desarrollado muchos tipos de muestreadores pasivos; algunos de estos dispositivos se ilustran en la siguiente figura:

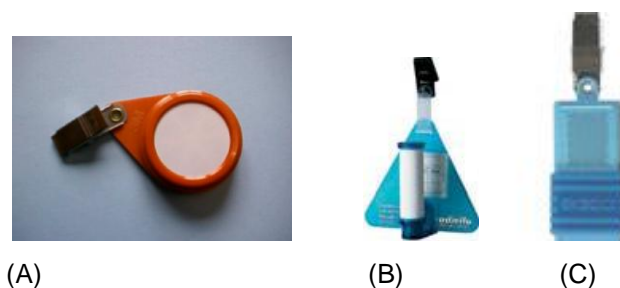


Figura 1.2. Muestreadores pasivos. (A) 3M 3500. (B) *Radiello*. (C) SKC ULTRA III

La mayoría de los muestreadores pasivos son axiales (Figura 1.1), pero también existe en el mercado un tipo de muestreador radial llamado *Radiello* (Figura 1.2.B y Figura 1.3), que consiste en un cuerpo de difusión cilíndrico de polipropileno poroso en el que se introduce un cartucho con adsorbente. El lecho adsorbente se elige en función del tipo de contaminante a adsorber. Gracias a su simetría, los analitos pueden acceder al material adsorbente alrededor de los 360° de superficie de difusión, dando como resultado una U significativamente mayor que si se tratara de una superficie axial, tal y como puede observarse en la Figura 1.4. Este aumento de U se traduce en una mayor masa adsorbida del contaminante y, por lo tanto, mayor sensibilidad, o bien tener la posibilidad de utilizar tiempos de muestreo más cortos. Esta capacidad de adsorción mayor garantiza una mínima difusión reversa que se traduce en resultados más reproducibles.

Los muestreadores pasivos presentan muchas ventajas. Son muy fáciles de usar, permitiendo que las muestras puedan ser recogidas por personal no cualificado y, sobre todo, no necesitan del empleo de bombas de aspiración, evitando así los inconvenientes asociados con ello. Resulta más cómodo para el trabajador y por lo tanto es mejor aceptado. Además, el hecho de no utilizar bombas, ni medidores de flujo para el control de los caudales, hace al muestreo pasivo más económico que el activo. Por otro lado, tienen una mayor autonomía por lo que son especialmente idóneos para su utilización en periodos de toma de muestra prolongados. Esta

particularidad los hace muy adecuados para tomar muestras en zonas de acceso restringido.



Figura 1.3. Diseño radial de *Radiello*

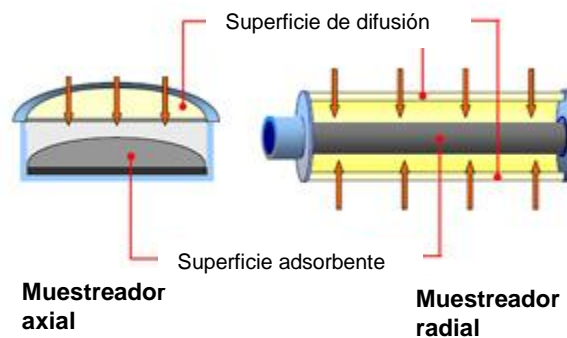


Figura 1.4. Muestreador radial mayor U que axial.

1.4.1.3 Técnicas analíticas

Las técnicas basadas en la Cromatografía de gases son las más comunes para la medida de la concentración de VOC en ambientes laborales.

Una vez que se ha recogido la muestra en el lecho adsorbente, debe transportarse al laboratorio y, si es necesario, se almacena hasta su posterior análisis. El primer paso para poder analizarla es la desorción del compuesto o compuestos de

interés retenidos. Dicha desorción puede ser de dos tipos. Una de ellas, la más utilizada habitualmente, es la desorción química con un disolvente. El contaminante pasa de esta manera a una disolución, una alícuota de la cual se analiza habitualmente por cromatografía de gases (GC). El otro tipo de desorción es la térmica, que se basa en la introducción del muestreador en un horno a temperatura adecuada donde se calienta y por el que pasa una corriente de gas inerte, facilitando la desorción del compuesto que posteriormente se recoge en una trampa fría. En una segunda etapa, esta trampa fría, que está unida al inyector de un cromatógrafo de gases mediante una línea de transferencia caliente, se calienta rápidamente y toda la masa recogida se inyecta en el cromatógrafo de gases donde se analiza. Esta técnica de desorción está especialmente recomendada en aquellos casos en los que la cantidad de masa recogida es muy pequeña ya que se analiza completamente mientras que en el caso de la desorción con disolvente solo se analiza una parte alícuota.

De entre los posibles detectores, el detector de fotoionización de llama (FID) conduce a resultados muy reproducibles. Por otra parte el detector de espectrometría de masas (MS) es más sensible utilizando la monitorización de un único ión por lo que además de permitir la cuantificación del compuesto a niveles más bajos que con el FID, permite también la identificación de los compuestos por su espectro de masas, lo que lo convierte en un método muy selectivo.

1.4.2 Métodos para el control biológico

Los métodos para la determinación de los metabolitos de los contaminantes son los que se aplican más frecuentemente en el control biológico. La toma de muestra está muy relacionada con el tipo de VLB. Las técnicas analíticas utilizadas generalmente para el análisis de estas muestras son la cromatografía líquida y gaseosa. Pero, tal y como se ha indicado en el apartado 1.3.1, la determinación de VOC sin metabolizar presenta numerosas ventajas respecto a la de sus metabolitos, por lo que, actualmente se están incorporando nuevos valores límite para estos compuestos sin metabolizar en orina, como el tolueno, que se incorporó a la propuesta de modificación de los BEIs en 2009 y se adoptó en el año 2010.

Las muestras de sangre deben recogerse en viales, que contendrán o no anticoagulantes en función de que el análisis se realice en sangre completa, suero o

plasma. Las muestras de orina se recogen en recipientes que pueden necesitar tratamientos especiales de limpieza según el biomarcador que vaya a analizarse.

La toma de muestra de aire exhalado requiere seleccionar la fracción de aire adecuada, de forma que necesita sistemas de muestreo que permitan la recogida de dicha fracción.

En general, los sistemas de toma de muestra pueden incluir la recogida del aire exhalado en un recipiente o bien la recogida de los analitos en un sólido adsorbente. En el primer caso se utilizan bolsas de materiales inertes -como Tedlar o Teflón-, tubos de vidrio, canister y se analiza posteriormente toda la muestra o una alícuota de la misma [40].

En el segundo caso se utilizan procedimientos basados en el uso de sistemas que recojan la fracción final del aire exhalado y hagan pasar posteriormente un volumen medido del mismo a través de un adsorbente. Ya que la concentración de los VOC en las muestras de aire exhalado es muy baja, resulta muy adecuada la utilización de técnicas de preconcentración antes de llevar a cabo el análisis cromatográfico. Los adsorbentes utilizados pueden ser carbón activo o bien polímeros porosos tales como Tenax o Chromosorb. Cuando se utiliza carbón activo la desorción se hace con disolventes, normalmente sulfuro de carbono, inyectando posteriormente una alícuota de la disolución en el cromatógrafo de gases. Los tubos rellenos con polímeros porosos se desorben térmicamente, lo que permite recuperar toda la muestra concentrada en un único análisis mejorándose considerablemente la sensibilidad.

Se han utilizado varios tipos de sistemas de captación de aire en procedimientos que incluyen la preconcentración [41]. Por ejemplo, uno de los diseños consiste en un tubo Haldane-Priestley modificado, que permite recoger la fracción final de aire espirado y concentrar alícuotas de aire exhalado de una o más exhalaciones en un tubo adsorbente relleno con carbón activo [26,42,43], o con un adsorbente adecuado para una desorción térmica [44-47]. Otro ejemplo es el sistema BIO-VOC, que también utiliza tubos para desorción térmica [48-50].

Debido a la alta sensibilidad y selectividad, la técnica de análisis instrumental preferible para el control biológico de exposición a VOC, mediante el análisis de estos compuestos sin metabolizar presentes en muy baja concentración en el fluido biológico, es la cromatografía gaseosa-espectrometría de masas.

Previamente al análisis instrumental de muestras biológicas es necesaria una etapa de concentración y preparación de muestra que permita separar el agente químico a analizar de la matriz en la que se encuentre retenido, tales como el espacio de cabeza, la extracción y la microextracción en fase sólida, ya que la mayoría de los instrumentos analíticos no pueden manejar la matriz directamente. Algunas de estas técnicas, como la extracción y la microextracción en fase sólida, permiten además la conservación de los analitos retenidos hasta su posterior análisis sin riesgo de pérdida o degradación de los mismos.

1.4.2.1 Espacio de cabeza

Este método de preparación de muestras consiste en una separación de los analitos desde su matriz hacia una fase gaseosa. En la matriz se quedan los compuestos pesados no volátiles de elevado peso molecular, lo que evita la contaminación de la columna de separación.

El análisis de espacio de cabeza o “headspace” (HS) tiene lugar en dos pasos. En el primero, la muestra líquida o sólida se coloca en un recipiente dejando sobre ésta un volumen de aire, y el recipiente -normalmente un vial- se cierra. Posteriormente este vial se calienta hasta una temperatura que se mantiene constante hasta que se alcanza el equilibrio entre las dos fases. En la segunda etapa se introduce una alícuota de la fase gaseosa del vial (el espacio de cabeza) en la corriente de gas portador que la arrastra a la columna cromatográfica, donde se analiza. En la Figura 1.5 pueden verse las dos etapas de HS-GC.

Esta técnica probablemente sea la más simple y, hasta hace relativamente poco, la técnica de preparación de muestra sin disolvente aplicada con más frecuencia.

La transferencia de la muestra se puede llevar a cabo de diversas maneras, tanto manualmente, por ejemplo utilizando una jeringuilla especial para gases, o bien automáticamente, ya sea emulando la inyección manual, o por medio de la presurización del vial de la muestra y transferencia controlada por tiempo – o volumen – de una alícuota del gas del espacio de cabeza directamente en la columna cromatográfica. La cantidad de analito transferido al instrumento es proporcional al volumen de la fase gaseosa, la constante de Henry, y la concentración de analito, suponiendo que el espacio de cabeza se encuentre en equilibrio con la muestra.

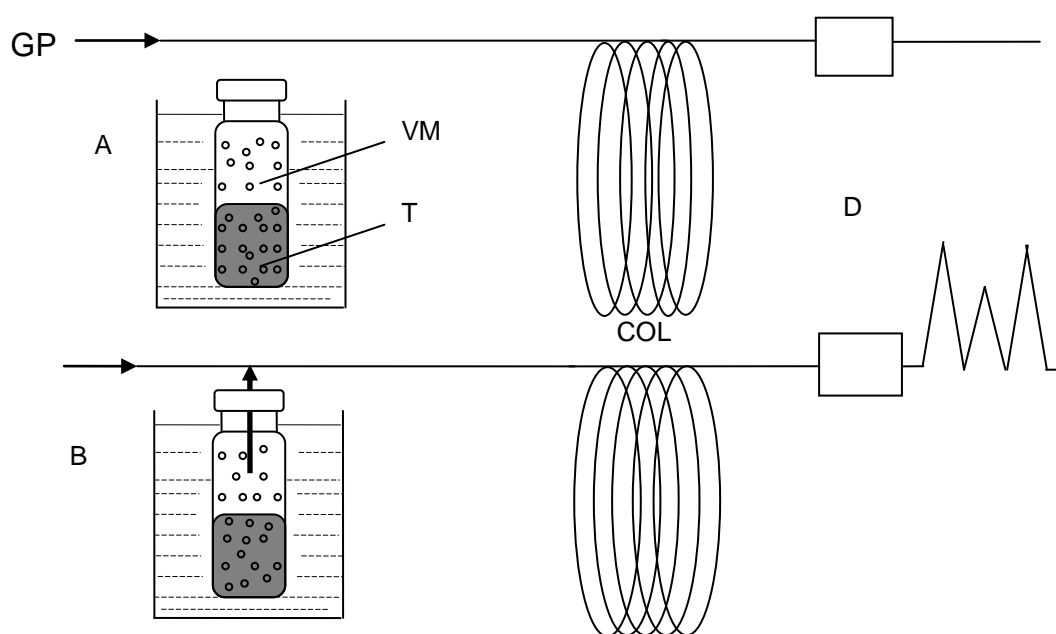


Figura 1.5. Principios del espacio de cabeza-cromatografía gaseosa. (A) Período de equilibrio y (B) transferencia de la muestra. GP = gas portador, VM = vial de muestra, T = termostato, COL = columna GC, D = detector.

El principal campo de aplicación de esta técnica es la determinación de VOC en diferentes matrices. Por este motivo, también tiene gran aplicación para el control biológico de la exposición medioambiental y ocupacional de disolventes orgánicos mediante su análisis en orina [51] o sangre. Se trata, sin duda, de uno de los métodos regulados más utilizados por las agencias medioambientales para determinar compuestos orgánicos volátiles en matrices sólidas y líquidas [52]. Además, este método es el método recomendado por la ACGIH para la determinación en orina y sangre de numerosos VOC para el control biológico [53]. La recopilación de métodos normalizados de análisis que periódicamente se publica en Alemania incluye también un gran número de métodos que utilizan dicha técnica para el análisis de una amplia variedad de compuestos presentes en fluidos biológicos [54].

Sin embargo, esta técnica tiene poca sensibilidad debido a la falta de un efecto de concentración, no pudiendo alcanzar una extracción exhaustiva, excepto para el caso de compuestos muy volátiles, y por consiguiente requiere una calibración cuidadosa. Por este motivo, los equipos automáticos actualmente disponibles en el

mercado han incorporado una trampa fría, de uso opcional, que permite la concentración de analito.

La técnica de espacio de cabeza, acoplada a espectrometría de masas (HS-GC-MS), es una potente herramienta para el análisis cualitativo y cuantitativo, altamente específico, que se ha utilizado con éxito para la determinación de compuestos orgánicos en agua [55-57] y, debido a que consigue un amplio rango lineal y sensibilidades y precisión satisfactorias, también se está utilizando en el análisis de fluidos biológicos [58-60].

1.4.2.2 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) constituye una alternativa para la determinación de compuestos orgánicos volátiles presentes en las matrices biológicas, utilizándose como etapa previa de preparación y concentración de muestra. Esta técnica de extracción está basada en el reparto selectivo de los componentes de la muestra entre dos fases, una de las cuales es un adsorbente sólido y la otra es un líquido. La SPE puede utilizarse como una etapa de preparación de la muestra para eliminar componentes indeseados, que se quedarán adsorbidos en el sólido, o bien como una etapa de preconcentración de los componentes de interés en la fase sólida.

Si los analitos de interés están adsorbidos en la fase sólida, se pueden desorber selectivamente mediante el lavado con un disolvente apropiado. Se emplea generalmente esta estrategia cuando los componentes de interés están presentes a bajos niveles, o se necesita separar más de un componente de polaridades bastante diferentes. Mediante esta técnica se consigue también el enriquecimiento de trazas de compuestos presentes a un nivel extremadamente bajo y la concentración de muestras diluidas.

El adsorbente generalmente está empaquetado en un tubo formando un lecho uniforme con buenas características de distribución de flujos. Mediante el paso de un líquido a través de este lecho, la técnica de extracción en fase sólida se convierte en una forma de cromatografía en columna gobernada por los principios de la cromatografía líquida.

La efectividad de la extracción mediante SPE depende, sobre todo, de la elección adecuada del adsorbente y del disolvente de elución. En la actualidad hay

disponibles una gran variedad de adsorbentes, ofreciendo cada uno una selectividad diferente.

La extracción en fase sólida para muestras líquidas se ha convertido en una técnica de laboratorio extensamente utilizada. Sin embargo, su uso no está principalmente enfocado al control biológico de trabajadores, sino a la evaluación de contaminantes en agua [61-64] y, en menor medida, a la determinación de drogas en estudios toxicológicos [65-67], debido, probablemente, a la mayor complejidad de las matrices biológicas en comparación con las muestras de agua.

La eficiencia del método SPE depende de muchos parámetros, como el adsorbente estacionario, el pH, el tratamiento previo de la muestra, los disolventes utilizados para lavar y eluir, el volumen de elución, y la velocidad del flujo durante las distintas etapas [68], que deben elegirse de forma que se aseguren recuperaciones adecuadas.

Esta técnica de extracción se utiliza actualmente más que la extracción con disolventes, puesto que es bastante más simple y rápida que esta última, reduce el consumo de disolvente utilizado, por lo que tiene menor coste, posee una mayor capacidad de análisis y es más fácil su automatización. Además, comercialmente hay disponibles una gran variedad de adsorbentes, y esto supone que el campo de aplicación de esta técnica es muy amplio y que pueda verse todavía incrementado con el desarrollo de nuevos materiales. Permite también la obtención de mejores recuperaciones, sin pérdida del analito de interés debido a una manipulación mínima de la muestra y, además, es un método más seguro ya que hay una menor exposición a agentes tóxicos. También se consigue una mayor exactitud por no haber contaminaciones cruzadas.

1.4.3 Microextracción en fase sólida para el control ambiental y biológico

Belardi y Pawliszyn publicaron las primeras aplicaciones de la técnica de Microextracción en Fase Sólida (Solid Phase Microextraction o SPME) en 1989 [69] y el primer diseño de un sistema de SPME se presentó en 1990 [70,71].

En 1993 Supelco introdujo la primera versión comercial del dispositivo SPME de laboratorio, que se muestra en la Figura 1.6.

El principio básico de esta técnica es la utilización como fase extractante de una fase polimérica que recubre una fibra de sílice fundida instalada sobre un soporte, obteniéndose un sistema semejante a una jeringa modificada, tal y como se representa en la Figura 1.6. La fibra se expone a la muestra durante un tiempo predeterminado, normalmente con agitación para favorecer el fenómeno de difusión y, de este modo, tiene lugar el transporte de los analitos de la muestra a la fase absorbente, si se trata de un polímero líquido, o a la fase adsorbente, si se trata de un sólido poroso.

El transporte de los analitos desde la matriz hacia el recubrimiento de la fibra comienza tan pronto como la fibra recubierta se pone en contacto con la muestra. Normalmente la extracción SPME se considera completa cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. En la práctica, esto significa que una vez alcanzado el equilibrio, la cantidad extraída se mantiene constante e independiente de aumentos adicionales en el tiempo de extracción. Las condiciones de equilibrio se pueden describir como:

$$m = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \quad 1.8$$

donde m es la cantidad extraída por el recubrimiento, K_{fs} es la constante de distribución entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra, V_f es el volumen del recubrimiento de la fibra, V_s es el volumen de muestra, y C_0 es la concentración inicial de un analito dado en la muestra.

La Ecuación 1.8 se puede modificar para tener en cuenta la existencia de otros componentes en la matriz considerando el volumen de cada fase individual y la constante de distribución correspondiente. Se puede interrumpir la extracción y analizarse la fibra previamente al equilibrio. Sin embargo, con el fin obtener datos reproducibles, es necesario mantener constantes las condiciones y el tiempo de extracción.

La Ecuación 1.8 indica que hay una relación directamente proporcional entre la concentración de la muestra y la cantidad de analito extraída, que es la base para la cuantificación del analito.

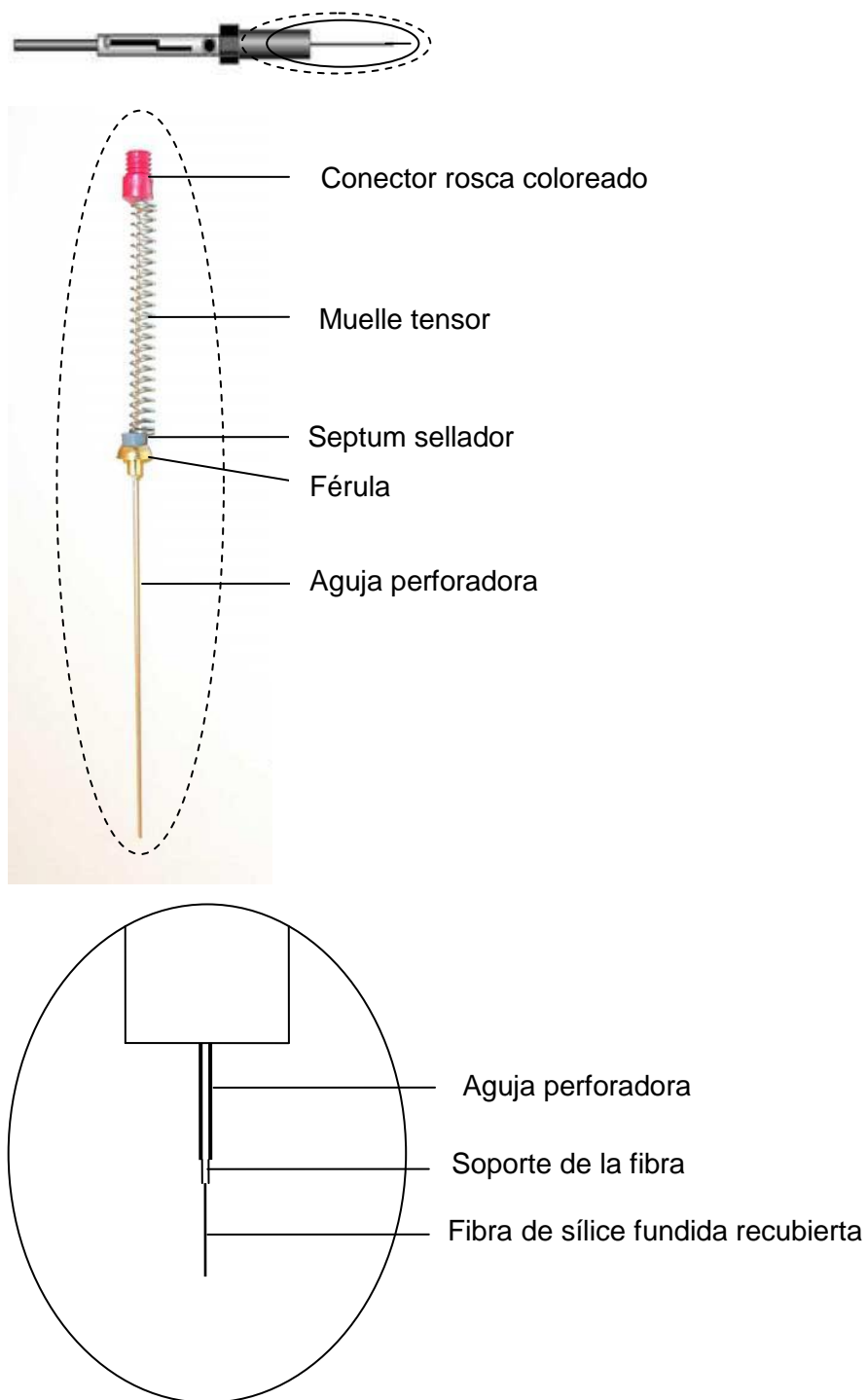


Figura 1.6. Esquema del primer dispositivo comercial SPME comercializado por Supelco.

Las fibras recubiertas se pueden utilizar para extraer analitos de muestras muy pequeñas. Pueden conseguirse extracciones completas para volúmenes de muestra

pequeños cuando las constantes de distribución sean razonablemente altas, permitiendo extracciones y transferencias al instrumento analítico rápidas, mientras que con la utilización de técnicas de preparación de muestras tradicionales resulta muy difícil.

Además, cuando el volumen de muestra es muy grande ($K_{fs}V_f \ll V_s$), la Ecuación 1.8 se puede simplificar a:

$$m = K_{fs} V_f C_0 \quad 1.9$$

que es clave de la utilidad de la técnica para la aplicación de campo. En esta ecuación la cantidad extraída de analito es independiente del volumen de la muestra, lo que significa que en la práctica, no es necesario recoger una muestra definida previa al análisis ya que la fibra puede exponerse directamente al aire, agua, etc. De este modo, la cantidad extraída de analito corresponderá directamente a su concentración en la matriz, sin depender del volumen de muestra [71]. Cuando se elimina el paso de la toma de muestra, se puede acelerar todo el proceso analítico, del mismo modo que se pueden evitar todos los errores asociados con las pérdidas de analito debidas a la descomposición o adsorción sobre las paredes del frasco que contiene la muestra.

En muestras líquidas la extracción con SPME puede llevarse a cabo principalmente de dos maneras diferentes: extracción directa (Figura 1.7.2a) y extracción con HS (Figura 1.7.2b). En la extracción directa la fibra recubierta se introduce dentro de la muestra y los analitos se transportan desde la matriz de la muestra a la fase extractante. Con el fin de facilitar la difusión de los analitos desde la muestra a los alrededores de la fibra y de ese modo acelerar el proceso de extracción, se requiere la agitación de la muestra. En el modo HS, es necesario el transporte de analitos a través de una barrera de aire antes de ser captados por la fibra. Esta variación evita el daño de la fibra por contacto directo con interferencias de elevado peso molecular y sustancias no volátiles presentes en la muestra, como es el caso de las proteínas presentes en la orina. Este modo de extracción permite también modificar la matriz variando, por ejemplo, el pH, sin dañar la fibra. Las cantidades de analito extraídas en el recubrimiento de la fibra serán idénticas siempre que los volúmenes de muestra y de espacio de cabeza sean iguales, debido al hecho de que la concentración en el equilibrio es independiente de la localización de la fibra en el sistema. Para la determinación de analitos muy volátiles, utilizando el modo HS se

obtienen resultados más sensibles. Una vez transcurrida la etapa de absorción o adsorción, la fibra se introduce dentro de la aguja para protegerla y almacenarla (Figura 1.7.3) hasta que los analitos se desorban térmicamente en el puerto de inyección del GC (Figura 1.7.4 y 1.8).

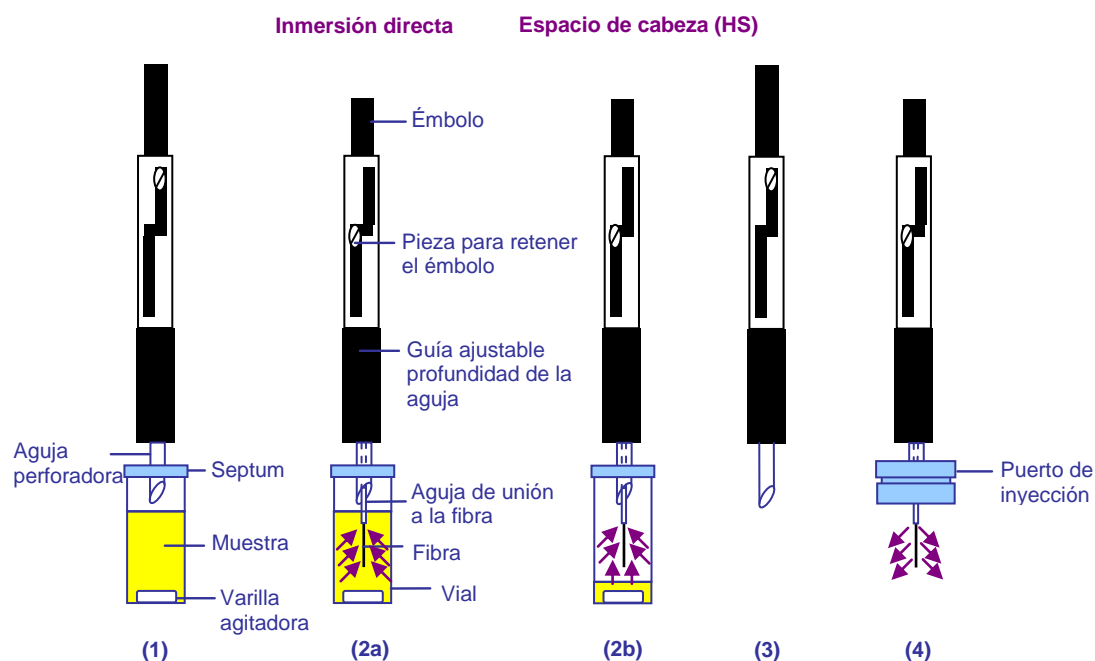


Figura 1.7. Diseño, componentes y fases del sistema de operación de SPME. (1) Fase 1: perforación del septum. (2) Fase 2a: exposición de la fibra y absorción o adsorción de contaminantes modo inmersión directa. Fase 2b: exposición de la fibra y absorción o adsorción de contaminantes modo espacio de cabeza. (3) Fase 3: transporte y conservación. (4) Fase 4: Desorción térmica de los analitos desde la fibra a la columna capilar del GC.

La elección del modo de toma de muestra tiene un impacto muy significativo sobre las cinéticas de extracción, ya que cuando el recubrimiento de la fibra se encuentra en el espacio de cabeza, los analitos se mueven primero desde el espacio de cabeza, seguida de una extracción indirecta desde la matriz, tal y como se muestra en la Figura 1.7.2.b. Por lo tanto, cuanto más volátil sea el analito a extraer más rápida será su extracción, y los analitos volátiles se extraerán más rápidamente que los semivolátiles, ya que se encuentran presentes en una mayor concentración en el espacio de cabeza, lo que contribuye a transportes de masa más rápidos a través del HS. La temperatura influye de manera significativa en la cinética del proceso, puesto

que determina la presión de vapor de los analitos. De hecho, bajo condiciones de agitación semejantes, los tiempos de equilibrio para compuestos volátiles son más cortos con el modo HS, debido, por un lado, a que una importante fracción de los analitos se encuentra presente en la fase gaseosa antes incluso del proceso de extracción ya que existe una gran interfase entre la matriz de la muestra y el espacio de cabeza, y por otro lado, los coeficientes de difusión son cuatro órdenes de magnitud mayores en la fase gaseosa que en el medio líquido. Sin embargo, debido a que la concentración de semivolátiles en la fase gaseosa a temperatura ambiente es pequeña, los coeficientes de transferencia de masas son sustancialmente más bajos, lo que se traduce en tiempos de extracción mayores, que se pueden mejorar utilizando una agitación muy eficiente o incrementando la temperatura de extracción [71]. Por lo tanto, la elección del modo de extracción debería hacerse en función de la matriz de la muestra, la volatilidad del analito y su afinidad por la matriz.



Figura 1.8. Desorción térmica de los analitos desde la fibra a la columna capilar del GC.

Las Ecuaciones 1.8 y 1.9 indican que la eficiencia del proceso de extracción depende de la constante de distribución K_{fs} , que es un parámetro característico que describe las propiedades de un recubrimiento y su selectividad por el analito frente a otros componentes de la matriz. La fase estacionaria sobre la fibra de sílice fundida puede ser de varios materiales y grosores (Tabla 1.2). El grosor del recubrimiento determina la sensibilidad del método, sin embargo también hay que tener en cuenta que cuanto mayor sea dicho grosor mayor será el tiempo de extracción. Por lo tanto, es importante utilizar el recubrimiento adecuado para una aplicación dada. El

recubrimiento se elige en función de su afinidad hacia el analito de interés, basándose en su polaridad y volatilidad. Por lo general, la polaridad de la fase polimérica debe ser similar a la de los analitos, debido a la afinidad de los compuestos por las fases de polaridades semejantes. Desde los comienzos de la aplicación de la técnica de SPME, ha habido un importante desarrollo en la aplicación de nuevas fibras y nuevos materiales. Se han desarrollado recubrimientos específicos para un rango de aplicaciones concretas (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Materiales, grosores y aplicaciones de los recubrimientos de fibra.

Grosor	Recubrimiento	Aplicaciones
Carboxen/Polidimetilsiloxano		
75 μm	Carboxen/PDMS	Gases y compuestos de bajo peso molecular.
85 μm	Carboxen/PDMS	
Polidimetilsiloxano (PDMS)		
7 μm	PDMS	Compuestos apolares de alto peso molecular.
30 μm	PDMS	Compuestos apolares semivolátiles.
100 μm	PDMS	Compuestos volátiles.
Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB)		
60 μm	PDMS/DVB	Aminas y compuestos polares.
65 μm	PDMS/DVB	Compuestos volátiles, aminas y compuestos aromáticos nitrogenados.
Poliacrilato		
85 μm	Poliacrilato	Compuestos polares semivolátiles.
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano		
50/30 μm	DVB/CAR/PDMS sobre fibra StableFlex ⁺	Compuestos volátiles y semivolátiles de 3-20 átomos de carbono. Análisis de compuestos traza.
50/30 μm	DVB/CAR/PDMS sobre fibra StableFlex ⁺ de 2 cm	
Polietilenglicol (PEG)		
60 μm	Carbowax (PEG)	Alcoholes y compuestos volátiles.

* el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible

El desarrollo de un método para la determinación de analitos mediante SPME requiere la optimización de una serie de variables relacionadas con las dos etapas que tienen lugar: la absorción/adsorción y la desorción.

Algunas de las variables que afectan al proceso son: el tipo de recubrimiento de la fibra, el tiempo de extracción, la fuerza iónica o contenido en sal, el pH, la temperatura, los efectos de matriz, la agitación y la posición de la fibra. Todas las variables deben mantenerse constantes durante la absorción/adsorción y la desorción, para garantizar así que las condiciones sean reproducibles.

La concentración de sal y el control del pH de la muestra pueden utilizarse para mejorar la extracción, siendo el principio similar al de los procedimientos de extracción con disolvente. Se añade directamente a la muestra una sal o tampón apropiados sin la necesidad de ningún instrumento específico. Otro parámetro que es muy importante para optimizar es la temperatura de extracción. A elevadas temperaturas los analitos se pueden desplazar de la matriz hacia el espacio de cabeza para una rápida extracción. Sin embargo, el coeficiente de distribución recubrimiento/muestra también disminuye con un aumento de la temperatura, dando lugar a una disminución en la cantidad de analito extraída.

Debido a su naturaleza y a la no utilización de disolventes, SPME se puede acoplar fácilmente a instrumentos analíticos de varios tipos. Ya que la fase extractante es no volátil, sólo los analitos extraídos se introducen en el instrumento. La sensibilidad de las determinaciones utilizando la técnica de SPME es muy alta, facilitando el análisis de trazas, pues, aunque en la mayoría de los casos no se extrae la totalidad de los analitos presentes en la muestra, todo el material extraído se transfiere al instrumento analítico.

El cromatógrafo de gases es el instrumento analítico más frecuentemente utilizado con SPME con fibras recubiertas. Pueden utilizarse los inyectores de cromatografía gaseosa estándar con SPME, como el split/splitless, siempre que se utilice un inserto estrecho con un diámetro interno próximo al diámetro externo de la aguja, con el objetivo de incrementar el flujo lineal alrededor de la fibra, dando lugar a un movimiento eficiente de los analitos desorbidos. Para que los analitos extraídos pasen por completo a la columna, el split debe permanecer cerrado durante la inyección SPME. Bajo estas condiciones, la desorción de los analitos desde la fibra es muy rápida, no solo porque los recubrimientos son finos, sino también porque las altas temperaturas del inyector producen una caída brusca en la constante de distribución recubrimiento/gas y un aumento en los coeficientes de difusión.

La utilización de esta técnica ha crecido significativamente en los últimos 20 años, como lo demuestra el elevado número de publicaciones que ha ido en aumento, además, año tras año. Desde que en 1993 Supelco introdujera el primer diseño comercial, SPME ha tenido un gran éxito como técnica de extracción y preconcentración. Esto ha conducido al desarrollo de otras técnicas relacionadas, entre las que se encuentran la microextracción en tubo (*in-tube* SPME), extracción con barra magnética (SMSE, Stir bar sorptive extraction) y microextracción con jeringuillas empaquetadas (*in-needle* SPME) [72,73]. También la SPME con fibra ha ido evolucionando con el desarrollo de nuevas fases poliméricas, la automatización con el desarrollo de dispositivos para acoplar automuestreadores, o nuevos materiales a los que se fija el recubrimiento y que proporciona mayor flexibilidad y, por lo tanto, mayor duración las fibras. Por ejemplo, se ha desarrollado una fibra nueva que contiene una aleación especial de metal en la aguja, el émbolo y la fibra que va recubierta (antes de sílice fundida). Esta aleación de metal le proporciona una mayor fuerza, dando como resultado una vida media de fibra hasta diez veces mayor (ver Figura 1.9).

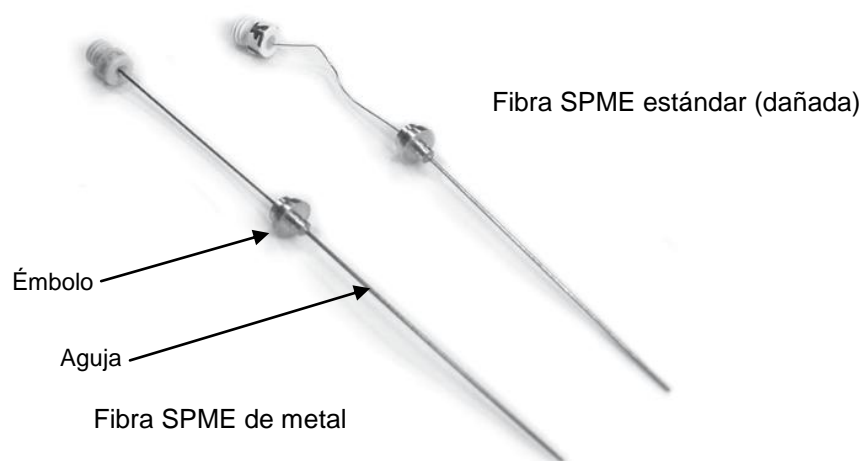


Figura 1.9. Nueva fibra SPME de metal frente a fibra SPME estándar dañada.

La utilización de la aleación de metal también ha permitido la optimización del proceso de recubrimiento de la fibra, controlando muchas variables que afectan a la reproducibilidad de la fibra, lo que la ha mejorado notablemente.

Otra ventaja significativa de la utilización de esta aleación de metal es que se trata de un metal muy inerte y que, por lo tanto, no afecta a los analitos extraídos.

Como ya se ha mencionado, la técnica de SPME es una técnica analítica que no utiliza disolventes, logrando la preconcentración de moléculas orgánicas procedentes de una gran variedad de matrices. Su aplicación resulta muy ventajosa en muchos campos por su simplicidad y rapidez, ya que combina la toma de muestra y la preparación de la muestra en un solo paso [70,74]. Esta técnica resulta muy adecuada porque se reduce la manipulación de la muestra, se facilita el transporte y conservación, proporciona mayores sensibilidades en comparación con HS convencional debido a que tiene lugar una concentración previa del analito en el revestimiento de la fibra [75], y resulta fácilmente asequible para los laboratorios de análisis. Por este motivo, SPME está siendo de gran aplicación en campos tan diversos como el medioambiental [76,77], para el análisis de alimentos [78], y para análisis clínicos [79].

Cuando la técnica de SPME se utiliza en el modo de HS resulta idónea para el análisis de muestras biológicas puesto que reduce las interferencias de la matriz y alarga la vida de la fibra. Por este motivo, la técnica HS-SPME puede ser muy útil para el control biológico de la exposición laboral a VOC.

Dicha técnica, acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), es una potente herramienta para el análisis cualitativo y cuantitativo, altamente específico, que se ha utilizado con éxito para la determinación de compuestos orgánicos en fluidos biológicos en el campo medioambiental, ocupacional y médico [80-93].

La aplicación de la técnica de SPME al control ambiental de la exposición laboral es todavía novedosa. Hasta ahora, se han utilizado dos sistemas de muestreo pasivo. Uno es con la fibra totalmente expuesta al aire. Esta extracción del analito permite, del mismo modo que la extracción del analito del espacio de cabeza de una muestra líquida, determinar la concentración en un lugar y durante un tiempo determinado, por lo que resulta muy útil para el muestreo puntual (ver sección 1.4.1). En este caso, el gradiente de concentración corresponde a la capa formada entre la matriz de la muestra y la superficie de la fibra. Parámetros como la velocidad del aire afectarán a la magnitud del grosor de esta capa. Un incremento en la velocidad del aire alrededor de la fibra puede reducir el grosor de la capa y afectar a la masa de analito absorbida o adsorbida. De este modo, la técnica de SPME ha demostrado ser

una herramienta práctica en lugares donde la concentración de analito puede ser considerada casi constante en el tiempo [94-102].

La otra forma de tomar la muestra consiste en la utilización de la técnica de SPME para el muestreo promediado en el tiempo de compuestos orgánicos presentes en el aire (ver sección 1.4.1). En este otro tipo de muestreo, la distancia conocida entre la entrada de la aguja y la punta de la fibra forma el gradiente de concentración a través del cual el analito se difunde hasta la superficie de la fase extractante. Pawliszyn y sus colaboradores desarrollaron un dispositivo de SPME para la cuantificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en aire por medio de su difusión hacia el recubrimiento de la fibra, la cual está retraída una distancia conocida dentro de su cubierta durante el período de muestreo (Figura 1.10) [103,104].

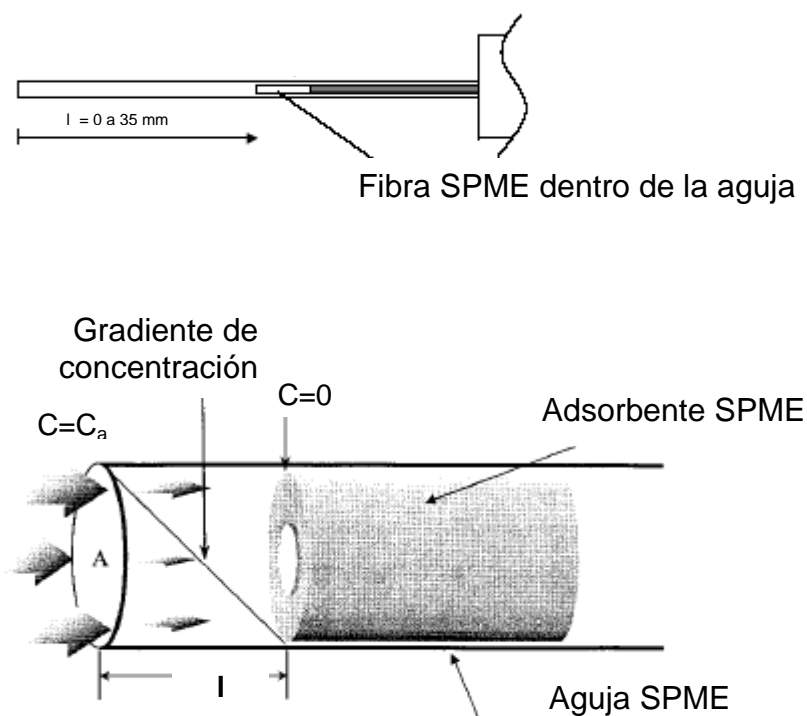


Figura 1.10. Dispositivo SPME como muestreador difusivo para muestreo integral.

1.5 Bibliografía

- [1] Directiva 1999/13/CE del Consejo de 11 de marzo de 1999 relativa a la limitación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes orgánicos en determinadas actividades e instalaciones.
- [2] Real Decreto 227/2006, de 24 de febrero, por el que se complementa el régimen jurídico sobre la limitación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles en determinadas pinturas y barnices y en productos de renovación del acabado de vehículos.
- [3] NTP. 2011. Report on Carcinogens, Twelfth Edition. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. Disponible en <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc12>.
- [4] Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- [5] Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales.
- [6] Directrices prácticas de carácter no obligatorio sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos en el trabajo (Artículos 3, 4, 5 y 6, y punto 1 del anexo II de la Directiva 98/24/CE).
- [7] R.F.M. Herber, J.H. Duffus, J.M. Christensen, E. Olsen, M.V. Park, Pure Appl. Chem. 73 (2001) 993.
- [8] R. Heinrich-Ramm, M. Jakubowski, B. Heinzow, J.M. Christensen, E. Olsen, O. Hertel, Pure Appl. Chem. 72 (2000) 385.
- [9] I.N.S.H.T. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2013. Ed. INSHT, Madrid. 2013.
- [10] Guía Técnica para la evaluación y prevención de los riesgos presentes en los lugares de trabajo relacionados con agentes químicos. Ed. INSHT.
- [11] UNE-EN 1540. Atmósferas en el lugar de trabajo. Terminología. AENOR, Madrid, 1999.
- [12] UNE-EN 689. Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la evaluación de la exposición por inhalación de agentes químicos para la comparación con los valores límite y estrategia de la medición. AENOR, Madrid, 1996.
- [13] Directiva 98/24/CE del Consejo, de 7 de abril de 1998, relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

- [14] Directiva 2000/39/CE de la Comisión, de 8 de junio de 2000, por la que se establece una primera lista de valores límite de exposición profesional indicativos en aplicación de la Directiva 98/24/CE del Consejo relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- [15] Directiva 2006/15/CE de la Comisión, de 7 de febrero de 2006, por la que se establece una segunda lista de valores límite de exposición profesional indicativos en aplicación de la Directiva 98/24/CE del Consejo y por la que se modifican las Directivas 91/322/CEE y 2000/39/CE.
- [16] Directiva 2009/161/UE de la comisión, de 17 de diciembre de 2009, por la que se establece una tercera lista de valores límite de exposición profesional indicativos en aplicación de la Directiva 98/24/CE del Consejo y por la que se modifica la Directiva 2000/39/CE de la Comisión.
- [17] A.C.G.I.H. Threshold limit values (TLVs) for chemical substances and physical agents and biological exposure indices (BEIs). ACGIH, Cincinnati, Ohio, USA.
- [18] D.F.G. List of MAK and BAT Values. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. WILLEY-VCH Verlag GMBH & Co. Weinheim, Alemania.
- [19] J.H. Duffus, *Pure Appl. Chem.* 65 (1993) 2003.
- [20] J. Obiols, *Control Biológico de los trabajadores expuestos a contaminantes químicos*. Ed. INSHT, Barcelona. 1998.
- [21] R.R. Lauwerys, *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring*. Biomedical Publications, California. 1983.
- [22] J.F. Periago, *Prevención, Trabajo y Salud*, 18 (2002) 4.
- [23] M. Imbriani, S. Ghittori, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78 (2005) 1.
- [24] T. Kawai, K. Mizunuma, Y. Okada, S. Horiguchi, M. Ikeda, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 68 (1996) 289.
- [25] P. Ducos, M. Berode, J.M. Francin, C. Arnoux, C. Lefèvre, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81 (2008) 273.
- [26] J.F. Periago, A. Luna, A. Morente, A. Zambudio, *J. Appl. Toxicol.*, 12 (1992) 91.
- [27] H. Drexler, T. Göen, K.H. Schaller, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82 (2008) 139.
- [28] UNE-EN 1232. *Atmósferas en el lugar de trabajo. Bombas para el muestreo personal de los agentes químicos. Requisitos y métodos de ensayo*. AENOR, Madrid, 1997.

- [29] UNE-EN 1076. Atmósferas en el lugar de trabajo. Tubos adsorbentes para la determinación de gases y vapores captados mediante bombeo. Requisitos y métodos de ensayo. AENOR, Madrid, 1997.
- [30] A. Berlin, R.H. Brown, K.J. Saunders (Eds.), Diffusive Sampling: An Alternative Approach to Workplace Air Monitoring, CEC Pub. No. 1055EN, Commission of European Communities, Bruselas, 1987.
- [31] E.D. Palmes, A.F. Gunnisson, Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 33 (1973) 78.
- [32] R.H. Brown, J. Environ. Monit. 2 (2000) 1.
- [33] UNE-EN 838. Exposición en el lugar de trabajo. Procedimientos de medida de gases y vapores que utilizan muestreadores por difusión. Requisitos y métodos de ensayo. AENOR, Madrid, 2010.
- [34] I.N.H.S.T. MTA/PV-II (2)/98. Protocolo de validación para la determinación de gases y vapores orgánicos en aire mediante su captación en muestreadores pasivos. INSHT, Barcelona. 1998.
- [35] HSE: Protocol for assessing the performance of a diffusive sampler. Methods for the determination of Hazardous Substances: MDHS 27. 1994.
- [36] E.R. Kennedy, T.J. Fischbach, R. Song, P.M. Eller, S.A. Shulman. "Guidelines for Air Sampling and Analytical Method Development and Evaluation" DHHS(NIOSH) Publication No. 95-117. 1995.
- [37] ASTM: Standard Practice for Evaluating the Performance of Diffusive Samplers, American Society for Testing and Materials (ASTM), D 6246, 1998.
- [38] ISO 16107. Workplace Atmospheres - Protocol for Evaluating the Performance of Diffusive Samplers, International Organization for Standardization (ISO), 1999.
- [39] Diffusive Samplers - for more detailed sampler design: M.E. Cassinelli, R.D. Hull, J. Crable, A. Teass. Protocol for the Evaluation of Passive Monitors, in Diffusive Sampling, Royal Society of Chemistry, London, England, pp. 190 - 202, 1987.
- [40] M. Alonso, J. Sanchez, TrAC 44 (2013) 78.
- [41] H.K. Wilson, A.C. Monster, Occup. Environ. Med. 56 (1999) 753.
- [42] J.F. Periago, A. Cardona, D. Marhuenda, J. Roel, M. Villanueva, J. Martí, A. Luna, Int. Arch. Occup. Environ. Health 65 (1993) 275.
- [43] J.F. Periago, A. Morente, M. Villanueva, A. Luna, J. Appl. Toxicol. 14 (1994) 63.
- [44] J.F. Periago, C. Prado, I. Ibarra, J. Tortosa, J. Chromatogr. A 657 (1993) 147.
- [45] C. Prado, J.F. Periago, A. Sepúlveda-Escribano, J. Chromatogr. A 719 (1996) 87.
- [46] C. Lourencetti, C. Ballester, P. Fernández, E. Marco, C. Prado, J.F. Periago, J.O. Grimalt, Anal. Chim. Acta 662 (2010) 23.

- [47] C. Prado, J.A. Tortosa, I. Ibarra, A. Luna, J.F. Periago, *J. Appl. Toxicol.* 17 (1997) 179.
- [48] D. Dyne, J. Cocker, H.K. Wilson, *Sci. Total. Environ.* 199 (1997) 83.
- [49] K. Jones, M. Meldrum, E. Baird, S. Cottrell, P. Kaur, N. Plant, D. Dyne, J. Cocker, *Ann. Occup. Hyg.* 50 (2006) 593.
- [50] J. Caro, M. Gallego, *Talanta* 76 (2008) 847.
- [51] B. Kolb, L.S. Ettre, *Static Headspace Gas Chromatography, Theory and Practice*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [52] U.S. Environmental Protection Agency (EPA). EPA Waste's official compendium of analytical and sampling methods. Disponible en <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/>.
- [53] Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 7th Ed. ACGIH, Cincinnati (OHIO) 2001.
- [54] D.F.G. Essential Biomonitoring Methods. From the MAK-Collection for Occupational Health and Safety. J. Angerer (ed.) Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania, 2006.
- [55] V.I. Safarova, S.V. Sapelnikova, E.V. Djazhenko, G.I. Teplova, G.F. Shajdulina, F.Kh. Kudasheva, *J. Chromatogr. B* 800 (2004) 325.
- [56] I. Missaoui, L. Sayedi, B. Jamoussi, B.B. Hassine, *J. Chromatogr. Science* 47 (2009) 257.
- [57] N. Sugaya, T. Nakagawa, K. Sakurai, M. Morita, S. Onodera, *J. Health Science* 47 (2001) 21.
- [58] I.A. Wasfi, A.H. Al-Awadhi, Z.N. Al-Hatali, F.J. Al-Rayami, N.A. Al-Katheeri, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 331.
- [59] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. B* 848 (2010) 1824.
- [60] M.J. Scotter, D.P.T. Roberts, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 386.
- [61] R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2958.
- [62] J-B Baugros, B. Giroud, G. Dessalces, M-F Grenier-Loustalot, C. Cren-Olivé, *J. Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 191.
- [63] Z.L. Zhang, J.L. Zhou, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 205.
- [64] S. Rodríguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 97.
- [65] K. Ensing, J.P. Franke, A. Temmink, X-H. Chen, R.A. de Zeeuw, *J. Forensic. Sci.* 37 (1992) 460.

- [66] N. Ferreiros, G. Iriarte, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, E. Ortiz, *J. Sep. Science* 31 (2008) 667.
- [67] E. Jagerdeo, M.A. Montgomery, M.A. LeBeau, M. Sibus, *J. Chromatogr. B* 874 (2008) 15.
- [68] C.F. Poole, A.D. Gunstilleka, R. Sethuraman, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 17.
- [69] R.G. Belardi, J. Pawliszyn, *Water Pollut. Res. J. Can.* 24 (1989) 179.
- [70] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [71] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, 1997.
- [72] H. Kataoka, *Curr. Pharm. Anal.* 1 (2005) 65.
- [73] C. Duan, Z. Shen, D. Wu, Y. Guan, *TrAC*, 30 (2011) 1568.
- [74] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 17.
- [75] G.A. Mills, V. Walker, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 267.
- [76] B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, *Critical Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 1.
- [77] G. Ouyang, J. Pawliszyn, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1059.
- [78] H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [79] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167.
- [80] C. Prado, J. Garrido, J.F. Periago, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 255.
- [81] K-J. Chia, S-D. Huang, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 49.
- [82] S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, V. Foà, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 309.
- [83] D. Poli, P. Manini, R. Andreoli, I. Franchini, A. Mutti, *J. Chromatogr. B* 820 (2005) 95.
- [84] L. Scibetta, L. Campo, R. Mercadante, V. Foà, S. Fustinoni, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 53.
- [85] Y. Liu, S. Muralidhara, J.V. Bruckner, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. B* 863 (2008) 26.
- [86] V. Walker, G.A. Mills, E.M. Stansbridge, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 784.
- [87] N. Rastkari, R. Ahmadkhaniha, M. Yunesian, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1568.
- [88] P.C.F. de Lima Gomes, E.D. D'Andrea, C.B. Mendes, M.E.P.B. de Siqueira, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 119.
- [89] D.M. Chambers, D.O. McElprang, M.G. Waterhouse, B.C. Blount, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5375.
- [90] C. Deng, W. Zhang, J. Zhang, X. Zhang, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 235.
- [91] D. Zuba, A. Parczewski, M. Reichenbacher, *J. Chromatogr. B* 773 (2002) 75.
- [92] V-S. Wang, M-Y Lu, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 24.
- [93] J-S. Chou, T-S. Shih, C-M. Chen, *JOEM* 41 (1999) 1042.

- [94] J. Koziel, M. Jia, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5178.
- [95] F. Augusto, J. Koziel, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 73 (2001) 481.
- [96] L. Tuduri, V. Desauziers, J.L. Fanlo, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 49.
- [97] S. Isetun, U. Nilsson, A. Colmsjö, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 319.
- [98] S. Isetun, U. Nilsson, *Analyst* 130 (2005) 94.
- [99] A.F.L. Godoy, L. Van Vaeck, R. Van Grieken, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 331.
- [100] V. Larroque, V. Desauziers, P. Mocho, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 106.
- [101] B.D. Pacolay, J.E. Ham, J.R. Wells, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 275.
- [102] M. Hippelein, *Chemosphere* 65 (2006) 271.
- [103] P. A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 206.
- [104] P. A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1513.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar y evaluar la aplicación de la técnica de extracción y microextracción en fase sólida (SPE y SPME) para el desarrollo de metodologías de toma de muestra y análisis que sean útiles tanto al control ambiental como biológico de la exposición laboral a compuestos orgánicos volátiles.

Los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

1. Desarrollar y evaluar un muestreador pasivo radial basado en SPME para su aplicación al control ambiental de la exposición, estudiando su comportamiento en concentraciones variables en el tiempo, situación que es habitual en ambientes laborales.
2. Desarrollar y evaluar un método de toma de muestra y análisis utilizando SPME que permita llevar a cabo el control biológico de la exposición a compuestos orgánicos mediante su análisis en la fracción final de aire exhalado.
3. Desarrollar y optimizar un método para el análisis de compuestos orgánicos sin metabolizar en orina mediante SPME.
4. Estudiar y evaluar la aplicación de la técnica de extracción en fase sólida para la toma de muestra en campo y la determinación de estireno sin metabolizar en orina.

Cada uno de estos objetivos específicos se tratará en un capítulo del presente trabajo.

Capítulo 3

MUESTREO PASIVO BASADO EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN LABORAL

3 MUESTREO PASIVO BASADO EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN LABORAL

3.1 Introducción

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica analítica relativamente moderna utilizada para la preconcentración de moléculas orgánicas procedentes de diferentes matrices, que ha resultado muy útil en muchos campos ya que combina el muestreo y la preparación de la muestra en un solo paso. Por ello, SPME se está utilizando ampliamente en campos tan diversos como el medioambiental [1,2], el de análisis de alimentos [3], y el de análisis biomédicos [4]. Actualmente se empieza a utilizar también en el campo de la evaluación de la exposición ocupacional de trabajadores expuestos. Se han desarrollado métodos para el control biológico de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en orina [5-8] y en muestras de aire exhalado para la evaluación de la exposición laboral a este tipo de contaminantes [9-11].

La aplicación de SPME al control ambiental en los lugares de trabajo es todavía un campo emergente. Hasta ahora, se han utilizado dos modos diferentes de toma de muestras. Uno es el muestreo puntual con la fibra totalmente expuesta a la muestra de aire. La extracción del analito de estas muestras puntuales permite, del mismo modo que la extracción del analito en el espacio de cabeza de una muestra líquida, determinar la concentración del contaminante en un momento y lugar de muestreo determinado. En este campo, se ha demostrado que la toma de muestra mediante SPME es una herramienta muy útil en lugares donde la concentración del analito podría considerarse constante en el tiempo [12-20].

El otro tipo de toma de muestra consiste en el uso de SPME para la determinación de la concentración media ponderada en el tiempo de compuestos orgánicos presentes en el aire. Con esa finalidad, Pawliszyn y sus colaboradores desarrollaron un dispositivo basado en SPME para la cuantificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en el aire por medio de su difusión hacia el recubrimiento de la fibra, que se encuentra retraída una distancia conocida en la aguja que la alberga durante el período de muestreo [21-24]. El dispositivo se ha probado en aire de interiores [23,24] y en campo para estireno [21], formaldehído [22], compuestos de sulfuro volátiles [25], cloruro de metileno [26], isocianato [27], óxido de etileno [28] y

furfural [29]. En general, en estos estudios se toman muestras durante periodos de tiempo largos para determinar la concentración media en ambientes de interior donde la concentración es constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, en ambientes laborales el trabajador está habitualmente expuesto a una concentración variable en el tiempo, ya que su actividad y ubicación suelen variar a lo largo de su jornada laboral.

Al igual que la mayoría de los muestreadores pasivos disponibles en el mercado, SPME se ha utilizado hasta el momento como un muestreador pasivo axial (ver apartado 1.4.1.2). No obstante, en este capítulo se estudia la utilización de la técnica de SPME como muestreador pasivo radial -de forma similar al muestreador pasivo Radiello- mediante la utilización de un cuerpo cilíndrico, a través del cual se mueven las moléculas de gas hacia el recubrimiento adsorbente de la fibra. El muestreador estudiado utiliza como barrera de difusión un cilindro de polietileno poroso, y como lecho adsorbente, una fibra de 80 μm de PDMS/Carboxen. La distancia entre el exterior del cilindro y la fibra sirve de camino de difusión. Se ha demostrado que este recubrimiento adsorbente resulta adecuado para la determinación de VOC en el análisis ambiental [2].

El muestreador se ha evaluado utilizando atmósferas de contaminantes en aire en concentraciones conocidas. En el estudio se han utilizado tolueno y clorobenceno, dos disolventes ampliamente usados en muchas operaciones industriales. También se han realizado experiencias con atmósferas de concentraciones conocidas de sevoflurano, un anestésico muy utilizado en quirófano, que permite una inducción rápida de la anestesia, idóneo sobre todo para las máscaras de inducción utilizada en cirugía pediátrica [30]. El personal de quirófano puede por lo tanto estar expuesto a este anestésico [31].

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el estudio del comportamiento del muestreador cuando las concentraciones no son constantes en el tiempo, una situación habitual en ambientes laborales donde las concentraciones de contaminante en el ambiente varían durante la jornada de trabajo en función del tiempo y el tipo de actividad que se esté realizando. Otro objetivo ha sido el estudio de la influencia de distintas variables como la temperatura, la humedad relativa, el tiempo de almacenamiento, la velocidad del aire, la difusión reversa y la adsorción competitiva sobre la cantidad de compuesto adsorbido por el dispositivo de muestreo.

Se ha estudiado también el comportamiento del muestreador en estaciones de servicio y los resultados se han comparado con los obtenidos con otro muestreador

difusivo cuyo uso está muy extendido, el muestreador para vapores orgánicos 3M-3500.

3.2 Experimental

3.2.1 Dispositivo de muestreo basado en SPME

El dispositivo de muestreo por difusión se basó en un prototipo desarrollado por Supelco, que se muestra en la Figura 3.1. Como resultado de la aleación especial de metal con la que, en este caso, está construido el prototipo, la fibra es más elástica y duradera, el émbolo más resistente, flexible, con menor tendencia a doblarse o romperse, y que ayuda a reforzar la aguja, más flexible y con una pared más fina que la aguja estándar de acero inoxidable, que atraviesa el septum más fácilmente, sin romperse. La aleación de metal, con la que está construida, no contiene nada de hierro y resulta más inerte que el acero inoxidable. El recubrimiento adsorbente que utiliza la fibra es de 80 μm de Carboxen/Polidimetilsiloxano y se acondicionó previamente en el inyector de un cromatógrafo de gases a 300°C durante una hora para eliminar los posibles contaminantes. El prototipo viene equipado con un tapón protector de Teflón[®] para colocar antes y después de tomar la muestra con el objetivo de evitar su contaminación. El soporte donde va enroscada la fibra (cuyas medidas son 5 cm x 2.5 cm) proporciona un adecuado acoplamiento del dispositivo a las superficies. El prototipo se puede inyectar manualmente en el cromatógrafo sin un adaptador gracias a su flexible diseño, tal y como se muestra en la Figura 3.2.

Tal y como se ilustra en el esquema de la Figura 3.3, el prototipo SPME se transforma en un dispositivo de muestreo pasivo radial al acoplarle una celda de difusión cilíndrica (fabricada en polietileno hidrofóbico poroso), proporcionada por Porex Technologies GmbH. La celda de difusión tiene un rango de porosidad de 7-12 μm , 5 mm de diámetro externo, 1.6 mm de diámetro interior, 1.7 mm de espesor de pared y 17.4 mm de longitud, y que se acopló fácilmente al sistema de SPME por medio de tapones de material inerte en ambos extremos.

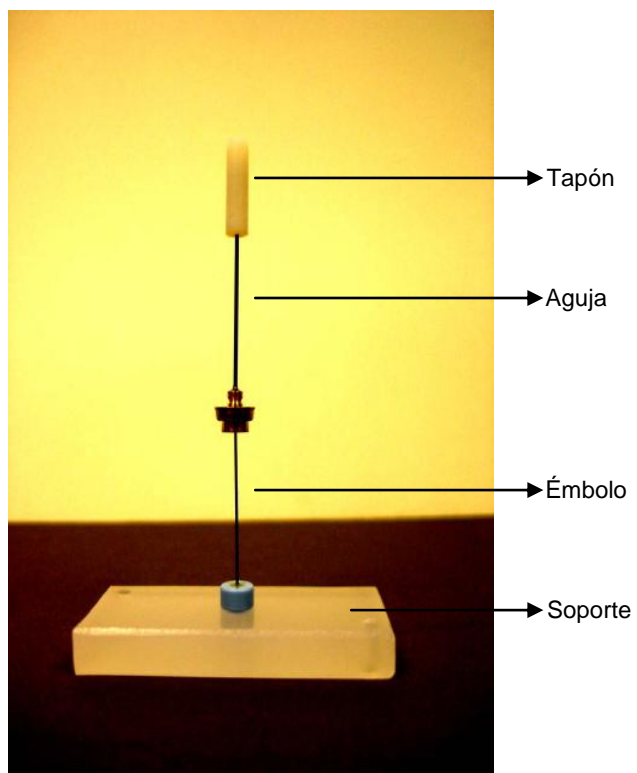


Figura 3.1. Prototipo SPME.

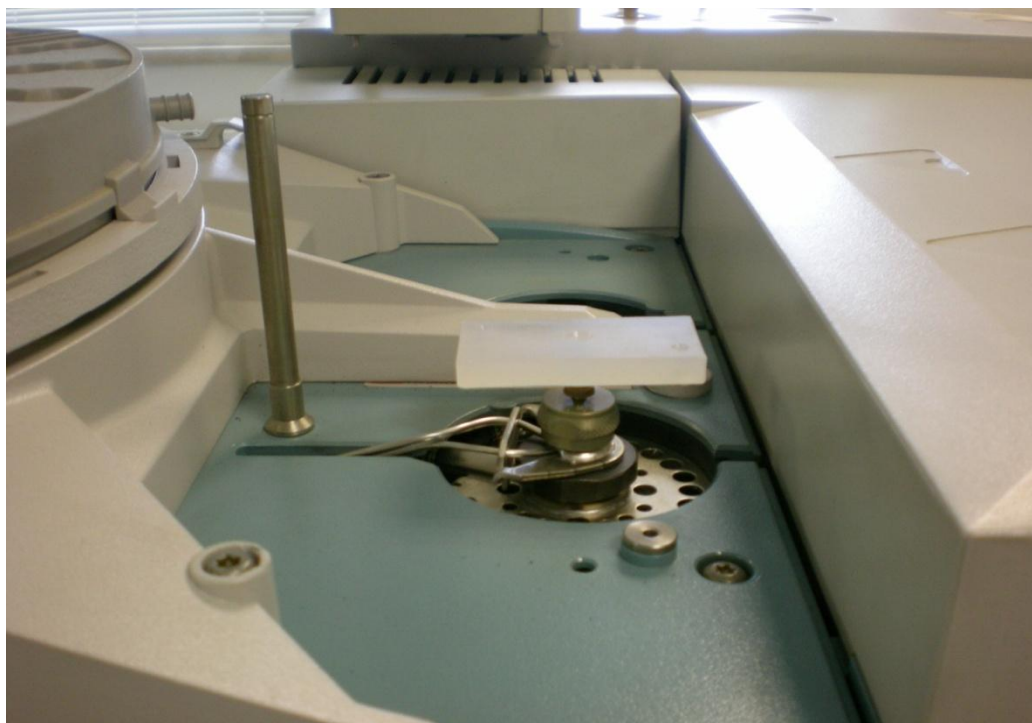


Figura 3.2. Soporte con fibra SPME introducida en el inyector del cromatógrafo.

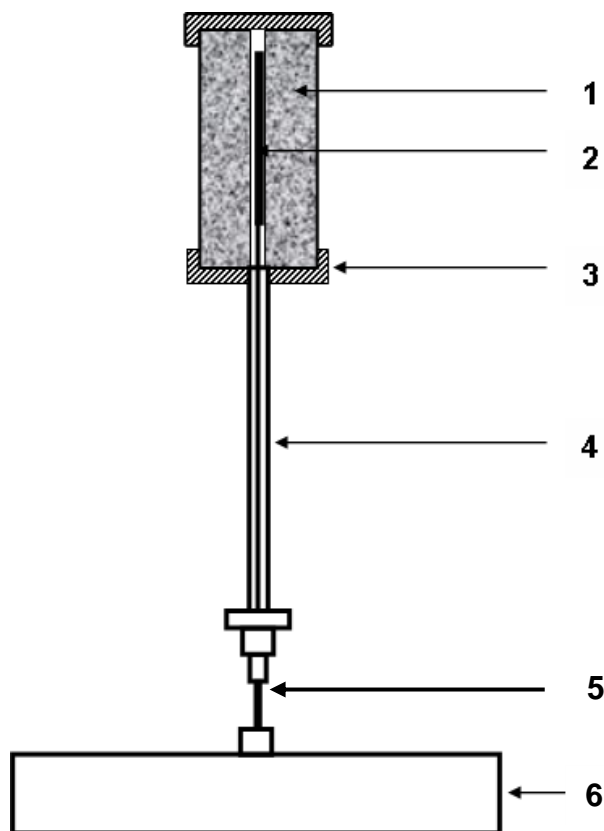


Figura 3.3. Esquema del dispositivo de muestreo pasivo basado en el prototipo SPME. 1= Cilindro hidrofóbico de polietileno como celda de difusión; 2= fibra de 80 μm de Carboxen/PDMS; 3= Tapones de material inerte; 4= Aguja; 5= Émbolo; 6= Soporte.

Antes de su uso, y también durante el almacenamiento, las fibras de SPME utilizadas en este estudio se protegieron mediante los tapones de Teflón[®]. Durante su utilización como muestreadores pasivos se les acopla la celda de difusión y, posteriormente, se hace descender el émbolo de forma que la fibra quede expuesta dentro de la celda para permitir la toma de muestra.

3.2.2 Determinación de la velocidad de captación por difusión

La determinación experimental de la velocidad de captación por difusión (U) para los contaminantes estudiados requiere la generación de atmósferas controladas

de concentración conocida de dichos contaminantes. El sistema empleado para generar dichas atmósferas se ilustra en la Figura 3.4. El sistema, construido en vidrio, consiste en un método dinámico basado en una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) que proporciona una velocidad de flujo constante del contaminante que se esté estudiando mediante el movimiento del émbolo de una jeringuilla (Hamilton). En este caso se ha utilizado tolueno (Fluka), clorobenceno (Merck) y sevoflurano (Abbott). El contenido de la jeringuilla se inyecta a través de un septum a la línea de aire y se evapora en el aire comprimido limpio que pasa a través del sistema. La humedad de la atmósfera se ajusta haciendo pasar la corriente de aire a través de un recipiente que contiene agua y que está sumergido en un baño termostático. La humedad relativa del caudal total de aire se puede controlar regulando la temperatura del baño.

El sistema incorpora un acondicionador de aire que permite controlar la temperatura del proceso y de la cámara de muestreo gracias al termostato del que dispone. De este modo, se ha podido estudiar el efecto de la temperatura, junto con el de la humedad, sobre la velocidad de captación por difusión. Se utilizó un termohigrómetro Testo 400, suministrado por Testo AG, capaz de medir en continuo la temperatura y la humedad relativa en la cámara de muestreo, y de almacenar los datos recogidos. El uso de un ventilador permite variar la velocidad del aire y así poder también estudiar el efecto de su variación sobre U.

La concentración de la atmósfera se verificó mediante un sistema independiente que consistió en la utilización de tubos adsorbentes mediante muestreo activo. Se han utilizado o bien tubos rellenos con 150 mg de Tenax TA (SKC), o bien tubos rellenos de carbón activo (SKC), conectados a la cámara de muestreo por un extremo y a bombas de aspiración por el otro.

En todos los casos, las concentraciones medidas mediante muestreo activo con los tubos rellenos de Tenax y con los de carbón activo coincidieron con la concentración teórica calculada según la Ecuación 3.1 a partir del caudal del aire y la velocidad de la jeringuilla en un 10% [32]. El valor de la concentración teórica se considera, por tanto, como la concentración verdadera del contaminante en la atmósfera patrón.

$$C = \frac{V \times \rho \times \% \times 1000}{Q \times 60} \quad 3.1$$

donde C es la concentración teórica de la atmósfera generada (mg/m^3),

V es la velocidad de la jeringuilla ($\mu\text{l}/\text{hora}$)

ρ es la densidad (g/ml)

Q es el caudal de aire (L/min)

% es la pureza

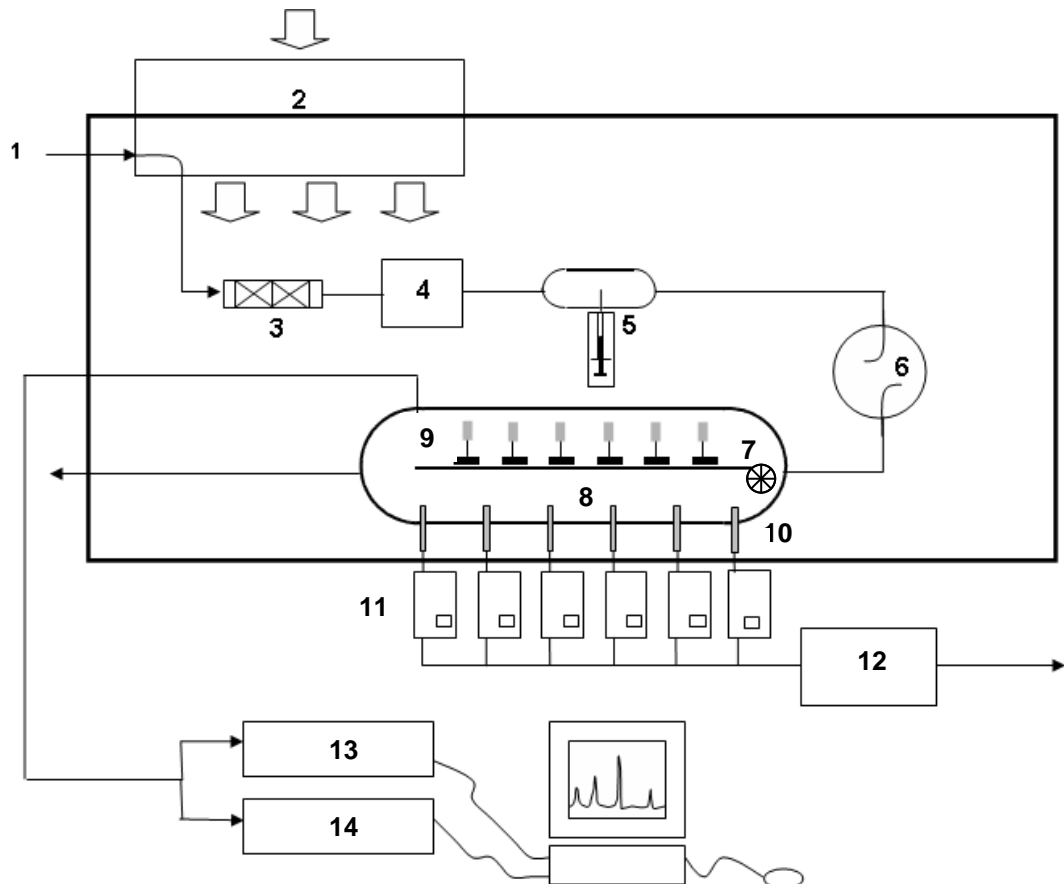


Figura 3.4. Esquema del sistema utilizado para generar la atmósfera controlada. 1: entrada de aire; 2: acondicionador de aire del proceso y de la cámara; 3: filtros; 4: humidificador; 5: inyector automático; 6: cámara de mezcla; 7: ventilador; 8: cámara de muestreo; 9: muestreadores pasivos; 10: tubos adsorbentes; 11: medidores de flujo; 12: bomba de aspiración; 13: detector de fotoionización; 14: termohigrómetro.

Tanto las concentraciones de las atmósferas generadas como su estabilidad en el tiempo se han verificado también en continuo mediante un detector de fotoionización (PID) MiniRae 2000, que se programó para promediar y almacenar los datos de la concentración registrada cada 50 seg.

Para determinar la velocidad de captación por difusión, se colocaron seis muestreadores difusivos en la cámara de muestreo del sistema de atmósferas controladas y se expusieron a diferentes concentraciones de tolueno ($2-38 \text{ mg/m}^3$) y/o de clorobenceno ($2-48 \text{ mg/m}^3$), utilizando diferentes tiempos de exposición (15-30 min y 30-60 min, respectivamente).

En el caso del sevoflurano, la velocidad de captación por difusión se calculó utilizando atmósferas de concentraciones conocidas en el rango entre 0.86 mg/m^3 y 5.05 mg/m^3 y con tiempos de exposición cortos, de 10 min. Todas las muestras se tomaron a una temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de $50 \pm 5\%$, condiciones habituales en quirófanos [33].

Después de la toma de muestra, los muestreadores se sacaron de la cámara, las fibras se retrajeron para introducirlas dentro de sus agujas y se taparon los extremos con los tapones de Teflón[®] hasta su análisis.

Las velocidades de captación por difusión se calcularon para cada uno de los muestreadores a partir de la cantidad de contaminante adsorbido, la concentración del compuesto en la atmósfera, y el tiempo de exposición [34,35], según la Ecuación 1.7.

3.2.3 *Estudio del comportamiento del muestreador a concentraciones variables de contaminante*

El sistema de generación de atmósferas de concentración conocida de contaminante se ha utilizado también para llevar a cabo dos ensayos con concentraciones de tolueno variables. En cada experiencia se utilizaron seis muestreadores. En el primer ensayo, la concentración de tolueno se mantuvo aproximadamente a 19 mg/m^3 durante 10 min, después a 190 mg/m^3 durante 5 min, a 92 mg/m^3 durante otros 5 min y durante 10 minutos a 19 mg/m^3 . El segundo ensayo consistió en mantener la concentración de tolueno a 2 mg/m^3 durante 5 min, después a una concentración de 190 mg/m^3 durante 3 min, a concentración cero durante 10 min, a 190 mg/m^3 durante 3 min y, finalmente a concentración nula durante 9 min. Los cambios en la concentración se obtuvieron ajustando la velocidad de flujo de tolueno en la bomba que impulsa la jeringuilla programable. En todos estos ensayos se ha mantenido una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de $50 \pm 5\%$.

Con objeto de comprobar la concentración media de la atmósfera generada en cada experiencia, y durante la realización de la misma, se recogieron seis tubos rellenos de Tenax mediante muestreo activo que se analizaron utilizando la desorción térmica.

En cada caso, se han recogido los datos de concentración en continuo por medio del PID con el fin de controlar la concentración de tolueno dentro de la cámara de exposición durante cada ensayo.

3.2.4 Estudio del efecto de la temperatura y de la humedad relativa de la atmósfera sobre el comportamiento del muestreador

El efecto de la humedad relativa y de la temperatura sobre la velocidad de captación por difusión del clorobenceno se ha estudiado para una concentración de 48 mg/m³ y un tiempo de exposición de 1 hora. En estas condiciones las experiencias se realizaron a dos temperaturas, 10 y 40 ± 2 °C, estudiándose humedades relativas de 20 y 80 ± 5% para cada una de las temperaturas. Los datos obtenidos se han analizado estadísticamente para estudiar la influencia de la temperatura y de la humedad relativa sobre la velocidad de captación por difusión mediante un análisis de varianza (ANOVA). Todos los análisis estadísticos realizados en este trabajo se han llevado a cabo utilizando el paquete informático Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, 2000).

3.2.5 Estudio de la estabilidad del analito en el muestreador

Se ha estudiado el efecto del tiempo de almacenamiento de las muestras tomadas. Para ello se preparó una atmósfera con una concentración de 4.4 mg/m³ de clorobenceno manteniendo una temperatura de 20 ± 2 °C y una humedad relativa de 50 ± 5% y se tomaron muestras exponiendo los muestreadores durante una hora. Posteriormente se analizaron, después de almacenarlos durante 24, 48 y 96 horas a temperatura ambiente y se compararon los resultados obtenidos con los correspondientes a los muestreadores analizados inmediatamente después de tomar la muestra.

3.2.6 Determinación del efecto de la velocidad del aire

El estudio del efecto de la velocidad del aire sobre la cantidad de contaminante captada por el adsorbente se realizó según la norma UNE [32]. Se expuso una serie de seis muestreadores difusivos a una atmósfera de ensayo de aproximadamente 60 mg/m³ de tolueno, a 20 ± 2 °C y 50 ± 5 % de humedad relativa, durante un periodo de 30 min. Se calculó la concentración másica observada (véase Apartado 1.2.1, Ecuación. 1.6) para seis velocidades de aire diferentes (0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 1, y 1.5 m/s), cubriendo el rango de velocidades que es más probable encontrar cuando se utiliza el muestreo pasivo en interiores [32]. Estas velocidades se consiguieron gracias a un ventilador con control de velocidad instalado en la cámara de muestreo (ver Figura 3.5) y se midieron con un anemómetro.

3.2.7 Sesgo debido a la selección de un adsorbente no ideal

Con objeto de conocer si el adsorbente es adecuado se estudió la difusión reversa o retro-difusión. Para ello se expusieron dos series de seis réplicas de muestreadores por difusión a una atmósfera de 60 mg/m³ de concentración de tolueno y a una humedad relativa del 80% durante 30 min. Transcurrido este tiempo, una de las series se extrajo de la cámara de muestreo y se analizó mientras que la otra se expuso a aire limpio (también con una humedad relativa del 80%) durante otras 7.5 h adicionales. En todos estos ensayos se ha mantenido una temperatura de 20 ± 2 °C.

3.2.8 Estudio del efecto de la adsorción competitiva

Para llevar a cabo el estudio del efecto de la adsorción competitiva se estudió el comportamiento del muestreador en atmósferas donde estaban presentes dos contaminantes, tolueno y clorobenceno. Para ello se expusieron seis muestreadores a tres concentraciones diferentes: una primera con una mezcla de gases de un 10% en volumen de tolueno y un 90% de clorobenceno, una segunda con una mezcla de clorobenceno y tolueno al 50%, y una última con un 90% de tolueno y un 10% de clorobenceno. En todos estos ensayos se ha mantenido una temperatura de 20 ± 2 °C

y una humedad relativa de $50 \pm 5\%$. Las velocidades de captación por difusión obtenidas se han comparado estadísticamente mediante un ANOVA.

3.2.9 Estudio de campo

El comportamiento del muestreador desarrollado se estudió en campo para la toma de muestra personal de 11 trabajadores expuestos a tolueno, como componente de los vapores de gasolina, en 2 estaciones de servicio. Con el fin de ser utilizado como muestreador personal, el dispositivo se acopló a una superficie provista con una pinza que se colocó en el cuello de la camisa del trabajador, en la zona de respiración. Junto a él se situó también otro muestreador pasivo, cuyo uso está muy extendido, como es el muestreador 3M-3500 (3M) (ver Figura 3.5) para vapores orgánicos (como ejemplo ver Figura 3.6). El tiempo de toma de muestra fue de 2 h. De esta forma se obtuvieron dos muestras simultáneas para cada trabajador que se analizaron posteriormente.



Figura 3.5. Muestreador para vapores orgánicos 3M-3500.

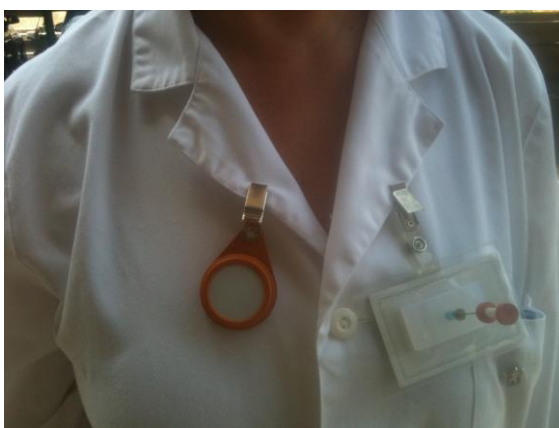


Figura 3.6. Muestreador diseñado y muestreador pasivo para vapores orgánicos.

3.2.10 Condiciones del análisis cromatográfico

La desorción de la fibra de SPME del muestreador se ha llevado a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un inyector split-splitless operando en modo splitless a 280°C con la purga cerrada durante los 2 minutos de la desorción. Se utilizó un microsello Merlin. Se instaló un inserto de inyección splitless (1.5 mm I.D., Agilent Technologies). El cromatógrafo está acoplado a un detector de ionización de llama (FID). La columna utilizada fue una columna capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y con 0.25 μm de espesor de película (J&W Scientific). La temperatura del horno se mantuvo a 35°C durante 2 min, después se aumentó a 5°C/min hasta los 60°C, que se mantuvieron durante 1 minuto. El gas utilizado como gas portador ha sido el helio a un flujo constante de 1.6 ml/min.

La cantidad de tolueno y clorobenceno extraída por la fibra de SPME se determinó utilizando curvas de calibración externas. Los patrones de tolueno y clorobenceno se prepararon en isooctano (Merck). Las disoluciones de trabajo utilizadas para la calibración se prepararon diluyendo diferentes cantidades de la disolución patrón en isooctano y se analizaron diariamente en las mismas condiciones que las fibras. El volumen de inyección fue de 0.5 μl .

Para el análisis de tolueno y clorobenceno presente en la atmósfera controlada de concentración conocida, los tubos rellenos de Tenax utilizados para verificar su concentración, se desorbieron térmicamente mediante un sistema de Desorción Térmica (Turbomatrix TD) (Perkin-Elmer), en dos etapas, con helio como gas portador a 11 psi, una temperatura del tubo y de la válvula de 250°C, 7 min de tiempo de desorción, una temperatura de la trampa baja y alta de -30 y 240°C, respectivamente, con un tiempo de estancia en ella de 4 min a 10 psi. La división de flujo a la entrada y a la salida de la trampa fue de 100 ml/min. Directamente conectado al Turbomatrix TD por medio de una línea caliente de transferencia a 200°C se encuentra un cromatógrafo de gases modelo Clarus 600 GC de Perkin-Elmer. Se ha utilizado una columna capilar J&W Scientific HP-5MS (30m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno) con 250 μm de espesor de fase. El horno se mantuvo a 50°C durante 4 minutos. El cromatógrafo de gases está conectado a su vez a un detector de espectrometría de masas Perkin-Elmer Clarus 600 T MS, que trabajó simultáneamente en modo scan y SIR (Selected Ion Recording). El rango de barrido fue de m/z 50 a m/z

300. La focalización del ión seleccionado fue a m/z 92 para el tolueno y de m/z 112 para el clorobenceno.

La cantidad de tolueno y clorobenceno extraída por los tubos rellenos de Tenax se determinó utilizando curvas de calibración externas. Se prepararon disoluciones patrón de tolueno y clorobenceno en metanol (Merck). En este caso, la curva de calibración se hizo inyectando diferentes cantidades de la disolución patrón en diferentes tubos rellenos de Tenax.

Por otro lado, para el análisis de tolueno y clorobenceno recogido de la atmósfera controlada de concentración conocida, los tubos de carbón activo utilizados se desorbieron químicamente con disulfuro de carbono (Panreac) durante una hora y, posteriormente, se analizaron con un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N, provisto de un detector de ionización de llama (FID). La columna utilizada fue una columna capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y con 0.25 μm de espesor de película (J&W Scientific). La temperatura del horno se mantuvo a 50°C durante 4 min, después se aumentó a 30°C/min hasta los 130°C, que se mantuvieron durante 1 minuto. El helio fue el gas utilizado como gas portador a un flujo constante de 2.1 ml/min. Se instaló un inserto (4 mm I.D., Agilent Technologies). Se trabajó con división de flujo (50:1, 106 ml/min). Las disoluciones patrón de tolueno y clorobenceno se prepararon en disulfuro de carbono.

Los muestreadores 3M utilizados para la toma de muestra de tolueno en el estudio de campo se analizaron en las mismas condiciones que las fibras de SPME. Las disoluciones patrón de tolueno se prepararon en disulfuro de carbono, disolvente utilizado para la desorción química del analito.

Los análisis del sevoflurano se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases GC Hewlett-Packard HP 6890, operando en modo Splitless, sin división de flujo. La desorción de la fibra de SPME tiene lugar a 280°C durante 2 minutos utilizando para ello un microsello Merlin. Se instaló un inserto de inyección silanizado (0.75 mm I.D., Supelco). Se utilizó una columna capilar HP-1 (60m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno) con 1 μm de espesor de fase (J&W Scientific). La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C durante 5 minutos, se aumentó a 25°C/min hasta 150°C, y se mantuvo a 150°C durante 10 minutos. Se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 1.2 ml/min.

Se utilizó como detector un espectrómetro de masas Hewlett-Packard MSD 5973, trabajando en modo simultáneo de barrido o escáner (scan) y con

monitorización del ión seleccionado (SIM). El rango de barrido fue de m/z 29 a m/z 300. La focalización del ión seleccionado fue a m/z 131. La fuente de iones se mantuvo a 230°C. El tiempo de retención fue de 4.5 minutos. Diariamente se llevaron a cabo autotunes con perfluorotributilamina (PFTBA) al igual que desorciones de blancos de la fibra para asegurar que la desorción era completa y que no existían compuestos que eluyeran al mismo tiempo que los compuestos de interés y pudieran así interferir.

3.3 Resultados y discusión

Las velocidades de captación por difusión calculadas para las diferentes combinaciones de concentraciones y tiempos de exposición estudiados para tolueno y clorobenceno se muestran en las Tablas 3.1 y 3.2, respectivamente. En las tablas también se muestra la media y la desviación estándar relativa (RSD) para cada una de las exposiciones ensayadas. Los valores de RSD dentro de un mismo día varían entre 2.6 y 6.5 % para el tolueno y de 1.8 a 6.4 % para el clorobenceno. Estos resultados son muy satisfactorios ya que incluyen la homogeneidad de las cantidades adsorbidas de analito en los muestreadores de SPME procedentes de lotes diferentes.

Se ha llevado a cabo un análisis de varianza para cada compuesto, cuyos resultados se muestran en las Tablas 3.3 y 3.4. Los valores P superiores a 0.05 indican que ninguno de los factores, ni la concentración, ni el tiempo de exposición, tiene un efecto estadísticamente significativo sobre U con un nivel de confianza del 95%.

A partir de los datos obtenidos, se ha calculado U para cada uno de los compuestos como la media de los valores, obteniéndose un valor de 2.12 y 2.56 ml/min y una precisión de 4.7% y 4.3% para el tolueno y el clorobenceno, respectivamente. Estos valores de U son mayores que los obtenidos por Pawliszyn y sus colaboradores en los estudios realizados utilizando la fibra de SPME como muestreador pasivo con la fibra retraída una distancia de 0.3 cm en el interior de la aguja [22,23,25,26]. Esto significa que para un mismo tiempo de muestreo el dispositivo estudiado recoge mayor cantidad de muestra. La proporción obtenida entre el valor de U para tolueno obtenido en el presente estudio (1.12 ml/min) y el valor de 0.0868 ml/min para tolueno [22] coincide con la obtenida entre el valor de U para

tolueno con el muestreador pasivo Radiello (74 ml/min) y el valor de U de los tubos rellenos de adsorbentes de Perkin-Elmer (6.28 ml/min Tenax TA).

Tabla 3.1. Velocidades de captación por difusión (U) para diferentes combinaciones de tiempo de exposición y concentración de tolueno

Concentración (mg/m ³)	Tiempo (min)	U (ml/min)		Media	RSD (%)
1.99*	60	2.05	2.05	2.14	4.8
		2.18	2.05		
		2.18	2.30		
9.66*	30	2.00	2.17	2.05	3.3
		2.00	2.09		
		2.00	2.05		
21.78*	30	2.17	2.26	2.18	6.5
		2.36	2.13		
		1.94	2.19		
19.24	15	2.21	2.15	2.13	3.0
		2.07	2.04		
		2.17	2.13		
19.00	60	2.22	2.28	2.15	4.2
		2.14	2.02		
		2.10	2.16		
36.02	15	2.11	2.00	2.05	2.6
		1.98	2.08		
		2.02	2.09		
38.02	30	1.98	2.28	2.10	6.3
		2.21	1.96		
		2.02	2.15		
38.01	30	2.06	2.25	2.17	3.8
		2.28	2.11		
		2.16	2.15		

RSD: desviación estándar relativa (%)

* utilizando muestreadores nuevos diferentes (segundo lote)

Tabla 3.2. Velocidades de captación por difusión (U) para diferentes combinaciones de tiempo de exposición y concentración de clorobenceno

Concentración (mg/m ³)	Tiempo (min)	U (ml/min)		Media	RSD (%)
2.6	30	2.38	2.50	2.47	2.2
		2.49	2.49		
		2.51			
2.17	60	2.46	2.86	2.56	6.4
		2.42	2.61		
		2.54	2.45		
4.78	60	2.48	2.48	2.51	1.8
		2.54	2.49		
		2.58			
23.89	60	2.71	2.58	2.65	3.2
		2.69	2.74		
		2.55			
48.35	30	2.57	2.54	2.60	4.1
		2.62	2.43		
		2.69	2.72		
46.94	60	2.64	2.65	2.58	3.6
		2.56	2.64		
		2.43			

RSD: desviación estándar relativa (%)

Tabla 3.3. ANOVA de U para el tolueno en función de la concentración y el tiempo de exposición

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: Concentración	0.0663958	3	0.0221319	2.38	0.0829
B: Tiempo	0.0343111	2	0.0171556	1.85	0.1703
Residual	0.390083	42	0.0092877		
Total (Corregido)	0.507013	47			

Tabla 3.4. ANOVA de U para el clorobenceno en función de la concentración y el tiempo de exposición

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: Concentración	0.0826249	3	0.0275416	2.57	0.0749
B: Tiempo	0.00683091	1	0.00683091	0.64	0.4315
Residual	0.289188	27	0.0107107		
Total (Corregido)	0.380687	31			

A pesar de que hay muchos datos sobre la repetibilidad de las medidas obtenidas con una fibra en concreto, existen muy pocos datos sobre la comparación entre diferentes fibras provenientes de lotes distintos. Sin embargo, este dato es relevante para saber si cada muestreador difusivo por separado proporciona una medida representativa de la concentración ambiental. Los valores de RSD obtenidos coincidieron con los valores encontrados en la bibliografía para la determinación de isocianato llevada a cabo por medio de la retracción de la fibra de SPME hacia dentro de la aguja [27]. Sin embargo, se han encontrados valores de RSD mayores que el 18% por Tumbiolo et al. [36] en un estudio de la determinación de BTEX en aire cuando se compararon tres fibras de Carboxen/PDMS, y también se han registrado valores de RSD por encima del 14% cuando se analizaron triésteres organofosforados [37]. En ambos estudios, la forma de muestrear –con la fibra totalmente expuesta a la mezcla estándar- es diferente a la utilizada en este trabajo y pequeños cambios en la velocidad del aire próximos a la fibra de SPME podrían tener un efecto significativo sobre la cantidad adsorbida de analito [12]. Por el contrario, la baja cantidad de muestra extraída puede también disminuir la reproducibilidad. Los resultados que aquí se muestran indican que la homogeneidad de los recubrimientos de Carboxen de las fibras es alto (2.7% de reproducibilidad en el recubrimiento de Carboxen-PDMS entre lotes de fibras, tal y como afirma Supelco [38]).

Bajo las condiciones de exposición estudiadas, U es constante para ambos compuestos, lo que permite que pueda determinarse la concentración media ambiental

a la que ha estado expuesto el muestreador en función de la masa de tolueno o clorobenceno analizada y del tiempo de medida (ver Ecuación 1.7 Apartado 1.4.1.2).

Ya que la concentración de la atmósfera patrón puede considerarse como la “concentración verdadera”, obtenida a partir de la concentración teórica calculada mediante la Ecuación 3.1, esto permite el cálculo de la exactitud del método. El sesgo, que es la desviación o diferencia entre los resultados obtenidos aplicando el procedimiento de medida estudiado con respecto al valor verdadero, es una expresión de la inexactitud del método y representa el error sistemático total. Para el cálculo del sesgo se calculó la concentración ambiental a que estuvo expuesto cada muestreador, utilizando el valor de U experimental determinado, mediante la Ecuación 1.6 en el Apartado 1.4.1.2. Las concentraciones calculadas de tolueno y clorobenceno y el valor medio obtenido se muestran en las Tablas 3.5 y 3.6. El sesgo relativo, expresado como $100 \cdot \left| \bar{X} - X_{\text{ref}} \right| / X_{\text{ref}}$ para cada concentración y condición de ensayo, se muestra en las Tablas 3.5 y 3.6, siendo X_{ref} el valor verdadero y \bar{X} el valor medio de los resultados obtenidos para cada concentración ensayada en el estudio de la influencia de la concentración de la atmósfera y del tiempo de muestreo [39]. Se ha obtenido una buena correlación entre los valores de las concentraciones verdaderas y los resultados obtenidos mediante el dispositivo de SPME.

Con esta configuración del muestreador difusivo (celda de difusión de 7-12 μm de porosidad y 1.7 mm de espesor de pared) se requieren periodos de muestreo menores de 60 min y concentraciones menores de 40 mg/m^3 de tolueno con el propósito de no exceder la capacidad de la fibra. Para el clorobenceno estos valores serían algo inferiores por tener una velocidad de captación por difusión mayor. Se podría obtener una reducción en la velocidad de captación por difusión aumentando la longitud del camino de difusión, bien incrementando el espesor de la pared de la celda de difusión, bien disminuyendo su tamaño de poro, o ambas cosas. Esto aumentaría las concentraciones de contaminante y los tiempos de exposición a los que podría estar expuesto el muestreador sin que se sature la fibra.

Tabla 3.5. Análisis de los datos experimentales. Cálculo del sesgo relativo para el tolueno.

Concentración (mg/m ³)	Tiempo (min)	Concentración calculada*		Media	Sesgo (%)
		(mg/m ³)			
1.99**	60	1.91	1.91	1.99	0.3
		2.02	1.91		
		2.02	2.14		
9.66**	30	9.35	9.81	9.43	2.4
		9.35	9.42		
		9.35	9.27		
21.78**	30	22.13	22.95	22.13	1.6
		23.85	21.72		
		19.79	22.33		
21.99**	30	23.85	24.96	23.80	8.2
		22.88	25.08		
		23.98	22.06		
19.24	15	19.84	19.35	19.11	0.7
		18.56	18.32		
		19.47	19.13		
19.00	60	19.71	20.23	19.11	0.6
		18.97	17.90		
		18.64	19.18		
36.02	15	33.09	31.43	32.15	10.7
		31.16	32.65		
		31.74	32.83		
38.02	30	35.24	40.55	37.31	1.9
		39.30	34.73		
		35.84	38.19		
38.01	30	36.65	40.00	38.52	1.4
		40.55	37.43		
		38.32	38.19		

* U = 2.12 mL/min

** utilizando muestreadores de distinto lote

Tabla 3.6. Análisis de los datos experimentales. Cálculo del sesgo relativo para clorobenceno.

Concentración (mg/m ³)	Tiempo (min)	Concentración calculada*		Media	Sesgo (%)
		(mg/m ³)			
2.6	30	2.41	2.53	2.52	3.1
		2.52	2.61		
		2.54			
2.17	60	2.08	2.42	2.16	0.5
		2.04	2.20		
		2.15	2.07		
4.78	60	4.70	5.30	4.76	0.4
		4.35	4.55		
		4.92			
23.89	60	25.22	23.95	25.10	5.1
		25.05	27.19		
		23.75	25.43		
48.35	30	48.40	47,87	48.86	1.1
		49,33	45,70		
		50,68	51,16		
46.94	60	48,29	48,40	47.22	0.6
		46,69	48,29		
		44.44			

* U = 2.56 mL/min

En relación a la utilización de SPME como muestreador pasivo mediante retracción de la fibra en el interior de la aguja, introducida por Pawliszyn y sus colaboradores, uno de los problemas planteados cuando los analitos se difunden hacia la fibra retraída es la adsorción del analito sobre el tubo de acero inoxidable, un proceso que puede agravarse a medida que la distancia que el analito recorre dentro de aguja se hace mayor [23,26,27]. El muestreador diseñado en este trabajo, en el que los analitos se difunden a través de la celda de difusión de PE en lugar de hacia la fibra retraída en el interior de la aguja de acero inoxidable puede resolver este problema.

Respecto al otro agente químico estudiado, el sevoflurano, en la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos de las velocidades de captación por difusión a las diferentes concentraciones estudiadas. La velocidad de captación por difusión media obtenida fue de 1.28 ml/min con una precisión de 10.7%.

Tabla 3.7. Velocidades de captación por difusión U obtenidas para distintas concentraciones de sevoflurano.

Concentración (mg/m ³)	U (ml/min)	Media	RSD (%)
0.86	1.45	1.38	10.9
	1.21		
	1.49		
1.28	1.25	1.29	15.4
	1.11		
	1.50		
1.71	1.28	1.27	6.1
	1.18		
	1.26		
	1.37		
5.05	1.17	1.19	9.0
	1.18		
	1.07		
	1.33		

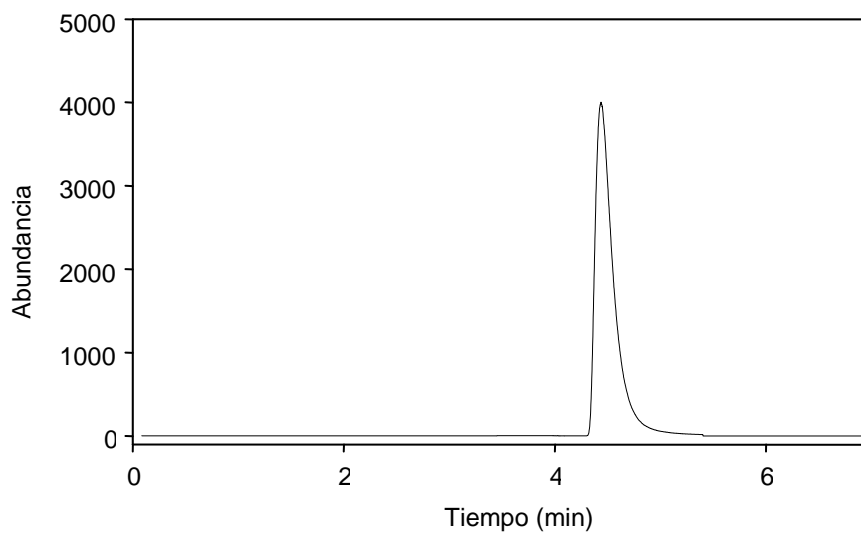
Se ha llevado a cabo un análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.8. El valor P superior a 0.05 indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor medio de U de una concentración y otro de otra concentración con un nivel de confianza del 95%.

La Figura 3.7 muestra un cromatograma obtenido de una fibra expuesta durante 10 min a una concentración de 1.28 mg/m³ de sevoflurano.

La Figura 3.8 muestra la recta de calibrado obtenida para el sevoflurano. El límite de detección calculado fue de 0.96 ng.

Tabla 3.8. ANOVA para sevoflurano.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	0.0662667	3	0.0220889	1.25	0.3430
Dentro de los grupos	0.176683	10	0.0176683		
Total (Corregido)	0.507013	47			

Figura 3.7. Cromatograma obtenido de una fibra expuesta durante 10 min a una atmósfera de concentración 1.28 mg/m^3 de sevoflurano

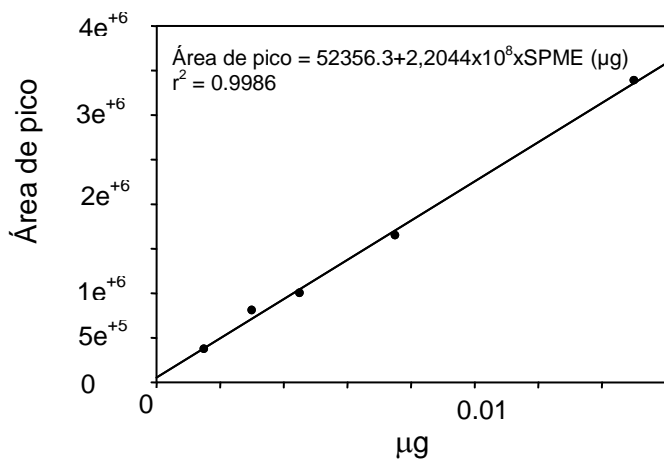


Figura 3.8. Recta de calibrado del sevoflurano

Los resultados indican que el prototipo de muestreador difusivo de SPME puede ser utilizado para medir las concentraciones esperadas de sevoflurano [30,40] durante períodos cortos de exposición.

En un ambiente laboral real, las concentraciones de vapores orgánicos a las que está expuesto un trabajador no son constantes, sino que varían en el tiempo y con la actividad del trabajador. El comportamiento del muestreador difusivo bajo estas condiciones puede diferir de aquellas en las que se ha obtenido la velocidad de captación por difusión, es decir a concentración de vapor constante.

Se ha comprobado el funcionamiento del muestreador difusivo bajo dos situaciones diferentes de muestreo con concentraciones de tolueno variables, tal como se describió en la sección 3.2.3. El objetivo es saber si el muestreador da una respuesta integrada, es decir, conduce a una concentración promediada en el tiempo de muestreo. La Figura 3.9 y la Figura 3.10 muestran las respuestas de la concentración de tolueno obtenidas por el PID para estas dos situaciones.

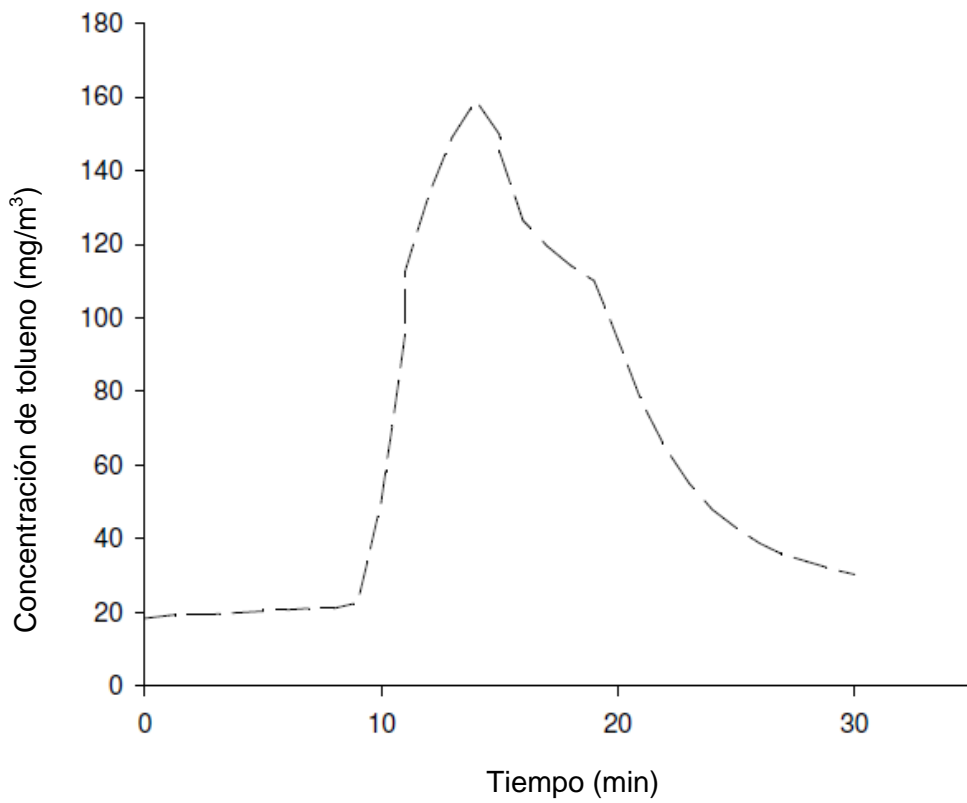


Figura 3.9. Respuesta del PID para la concentración de tolueno. Ensayo 1.

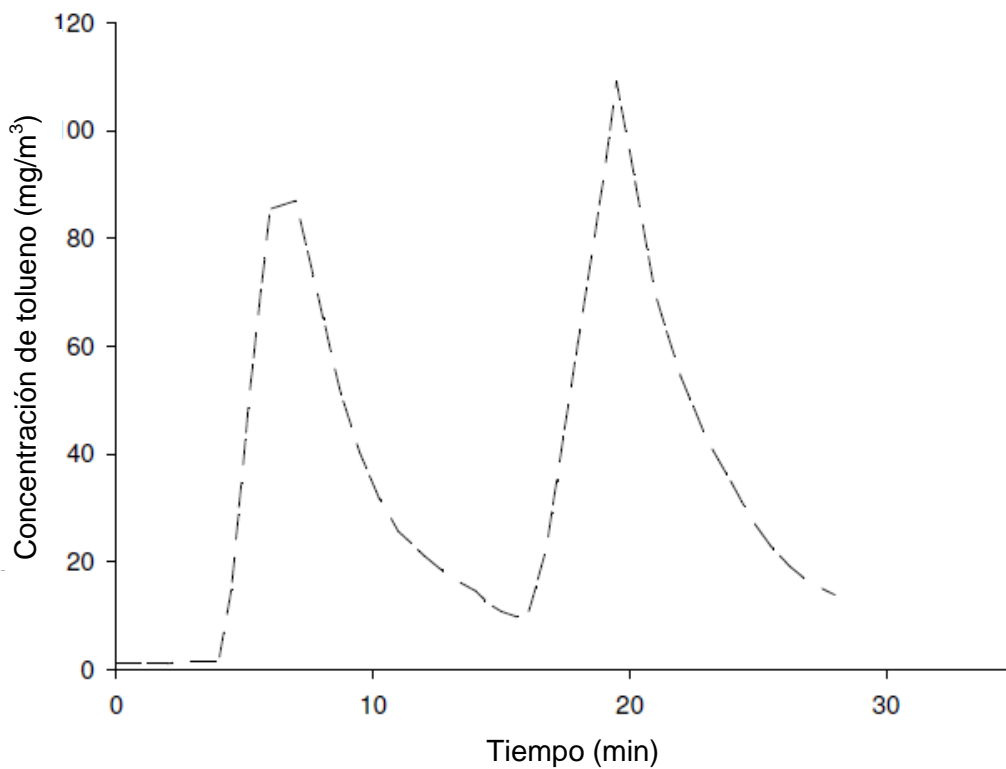


Figura 3.10. Respuesta del PID para la concentración de tolueno. Ensayo 2.

A partir de la masa adsorbida de tolueno por los muestreadores expuestos durante los 30 min del periodo de muestreo, se determinó la concentración media ponderada en el tiempo utilizando la velocidad de captación por difusión determinada de 2.12 mL/min. Los resultados obtenidos para cada uno de los ensayos de concentraciones variables se muestran en las Tablas 3.9 y 3.10. Asimismo se presentan en ellas los resultados obtenidos de la concentración teórica, la concentración media del PID y la obtenida utilizando muestreo activo, con tubos rellenos con Tenax.

Tabla 3.9. Resultados del ensayo 1 de concentración variable de tolueno

	Concentración obtenida (mg/m ³)
SPME-TWA*	57.2
	64.1
	58.3
	55.4
	55.0
	56.8
Media	57.8
Desviación estándar	3.3
RSD (%)	5.7
Valor teórico	59.9
Media PID	61.7
Muestreo activo	60.1

* utilizando velocidad de captación por difusión U=2.12 ml/min

Tabla 3.10. Resultados del ensayo 2 de concentración variable de tolueno

	Concentración obtenida (mg/m ³)
SPME-TWA*	34.3
	32.5
	32.6
	38.1
	33.8
	34.0
Media	34.2
Desviación estándar	2.0
RSD (%)	6.0
Valor teórico	36.3
Media PID	34.9
Muestreo activo	33.7

* utilizando velocidad de captación por difusión $U=2.12$ ml/min

Los resultados indican que existe una buena correlación entre las concentraciones medias ponderadas en el tiempo obtenidas por los muestreadores difusivos diseñados y las obtenidas mediante el muestreo activo, el PID, y con los valores teóricos. Este hecho indica que el muestreador diseñado actúa como un muestreador pasivo del que se obtiene la concentración media durante el tiempo de exposición. Los valores de la RSD son similares a los obtenidos en experimentos de exposición constante llevados a cabo para obtener la velocidad de captación por difusión.

Las velocidades de captación por difusión obtenidas a distintas temperaturas y humedades relativas para una misma concentración y tiempo de exposición se muestran en la Tabla 3.11. Se ha llevado a cabo un análisis de varianza con respecto a los dos factores: temperatura y humedad relativa. Los resultados, que se muestran en la Tabla 3.12, indican que, debido a que el valor P es mayor de 0.05, la humedad relativa no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el valor de U con un 95% de nivel de confianza. Sin embargo, la temperatura, cuyo valor P es menor de 0.05, sí tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el valor de U con el mismo

nivel de confianza. Un análisis posterior sobre el efecto de las diferentes temperaturas, que se muestra en la Tabla 3.13, ha demostrado que U a una temperatura de 10°C difiere significativamente de la U a 20 y 40°C, lo que coincide con los estudios realizados con la misma fibra de Carboxen/PDMS para óxido de etileno [28], cloruro de metileno [41] y éteres de propilenglicol [42]. En estos trabajos se afirma que los cambios en los coeficientes de difusión con la temperatura podrían explicar que la velocidad de captación por difusión sea menor a bajas temperaturas. También se debe tener en cuenta que, como la adsorción es un proceso exotérmico, la disminución de la temperatura favorece el aumento de la masa de analito recogida. Por lo tanto, la temperatura tiene efectos opuestos sobre la velocidad de captación por difusión, siendo la reducción en la difusividad molecular de las especies volátiles el efecto destacado a baja temperatura. Para la utilización del muestreador a temperaturas inferiores de 20 °C se deberá recalcular U.

Tabla 3.11. Velocidades de captación por difusión (U) para el clorobenceno a distintas combinaciones de temperatura y humedad relativa

Temperatura	Humedad relativa	U (ml/min)
10°C	80%	2,25
		2,33
		2,19
		2,20
		2,37
10°C	20%	2,53
		2,27
		2,50
		2,39
		2,44
40°C	20%	2,76
		2,37
		2,70
40°C	80%	2,53
		2,72
		2,61
		2,43
		2,49

Tabla 3.12. ANOVA de U para el clorobenceno en función de la temperatura y la humedad relativa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: Temperatura	0.257532	1	0.257532	17.55	0.0008
B: Humedad relativa	0.0545082	1	0.0545082	3.71	0.0731
Residual	0.22011	15	0.014674		
Total (Corregido)	0.507013	17			

Tabla 3.13. Procedimiento de comparación múltiple. Diferencia estimada entre cada par de U medias.

Contraste de temperaturas (°C)	Diferencia	Límites +/-
10-20	*-0.237	0.142041
10-40	*-0.22925	0.123011
20-40	0.00775	0.147841

* indica una diferencia estadísticamente significativa

En la Tabla 3.14 se muestran las velocidades de captación por difusión para clorobenceno obtenidas para diferentes tiempos de almacenamiento. Los estudios se realizaron en todos los casos a una misma concentración (4.4 mg/m^3) y tiempo de exposición (60 min). Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.15 y que indican que, debido a que el valor P es mayor que 0.05, el tiempo de almacenamiento no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre U con un nivel de confianza del 95%. Por tanto, una vez tomada la muestra esta puede almacenarse por lo menos durante 4 días a temperatura ambiente antes de efectuar el análisis.

Tabla 3.14. Velocidades de captación (U) para el clorobenceno a diferentes tiempos de almacenamiento.

Tiempo (h)	U (ml/min)
0	2.48
	2.54
	2.58
	2.48
	2.49
24	2.50
	2.54
	2.52
	2.76
	2.59
48	2.39
	2.45
	2.57
	2.61
	2.45
96	2.53
	2.34
	2.64
	2.85
	2.45

Tabla 3.15. ANOVA de U del clorobenceno en función del tiempo de almacenamiento.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	0.02512	3	0.00837333	0.56	0.6469
Dentro de los grupos	0.2378	16	0.0148625		
Total (Corregido)	0.26292	19			

Con relación al estudio de la influencia de la velocidad del aire y con el fin de averiguar el rango de velocidades en el que se podía ensayar y utilizar el muestreador,

se han comparado los valores medios de la concentración másica observada en el rango de velocidades del aire comprendido entre 0.15 m/s y 1.50 m/s.

Se han comparado los valores medios de las concentraciones observadas para cada velocidad del aire. Se ha representado en un gráfico el valor medio en función de la velocidad del aire. Se ha determinado la velocidad del aire que correspondía a una concentración observada del 90 % y 110 % de su valor máximo (meseta) (Figura 3.11). Es recomendable que los muestreadores se ensayen y se utilicen en condiciones tales que el intervalo de velocidades de aire corresponda a la zona de la meseta [32].

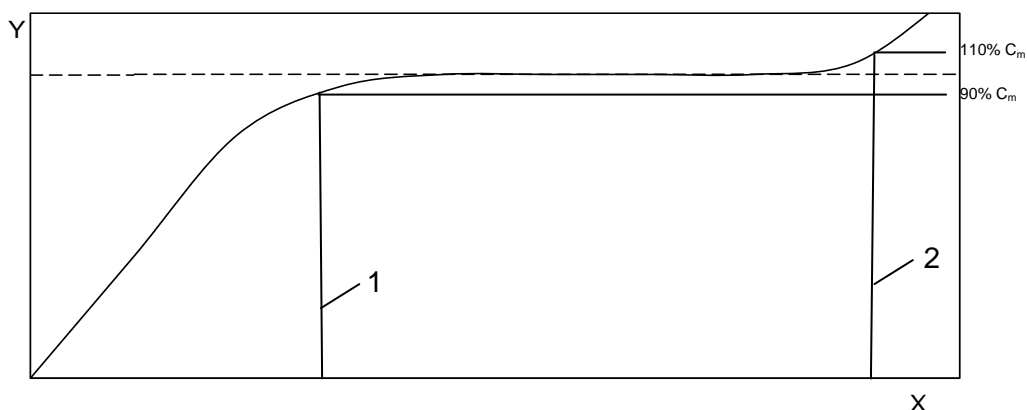


Figura 3.11. Relación típica entre la velocidad del aire y la concentración másica observada para los muestreadores por difusión.

- | | | | |
|-------|---|---|---------------------------|
| X | Velocidad del aire alrededor del muestreador por difusión | 1 | Velocidad del aire mínima |
| Y | Concentración másica observada del analito C_a | 2 | Velocidad del aire máxima |
| C_m | $C_{a, \text{meseta}}$ | | |

Puesto que la influencia del movimiento del aire en el funcionamiento de un muestreador por difusión depende de la geometría del muestreador y no del analito seleccionado, únicamente es necesario realizar este ensayo para un muestreador por difusión dado con un analito representativo [32].

Tal y como se muestra en la Tabla 3.16, la respuesta del muestreador es adecuada a partir de 0.20 m/s, ya que se alcanza un valor del 90% de su máxima

concentración. Estos resultados coinciden con los de otros estudios que afirman que los muestreadores pasivos requieren una velocidad mínima para ser eficientes. Una velocidad del aire media mayor que 0.20 m/s se puede encontrar en una gran cantidad de entornos laborales, pero el técnico de prevención debería asegurarse de que se van a dar estas condiciones con el fin de obtener un rendimiento óptimo del muestreador [43,44]. El muestreador debe utilizarse en condiciones tales que el intervalo de velocidades de aire esperado sea entre 0.2 y 1.5 m/s. Esto significa que el muestreador es independiente de la velocidad del aire en condiciones típicas del entorno laboral, lo que coincide con el muestreador Radiello de geometría radial similar [45]. Todas las experiencias realizadas en el sistema de atmósferas de concentración conocida se han llevado a cabo con una velocidad del aire con un valor de 0.3 m/s.

Tabla 3.16. Resultados del ensayo de la velocidad del aire.

Velocidad del aire (m/s)	Concentración observada (mg/m ³)	% concentración máxima (56.25 mg/m ³)
0.15	44.50	79.1
0.20	50.80	90.3
0.30	54.63	97.1
0.40	55.95	99.5
1.00	56.25	100.0
1.50	56.25	100.0

El sesgo debido a la selección de un adsorbente no-ideal se ha calculado a partir de la diferencia entre las masas medias captadas por dos series de muestreadores. La serie 1 de muestreadores difusivos es la que estuvo expuesta durante 30 min y después se cerró, y la serie 2 es la que estuvo expuesta únicamente a la corriente de aire durante otras 7.5 h adicionales. En la Tabla 3.17 se muestran las masas recogidas por cada una de las dos series de muestreadores, sus medias y la diferencia entre las medias en porcentaje, que es el sesgo debido a la selección de un adsorbente no ideal [32].

Tabla 3.17. Sesgo debido a la difusión reversa (n=6). Masa captada (μg).

	Serie 1	Serie 2
	3.72	3.55
	4.31	4.12
	3.83	3.99
	3.91	3.89
	4.35	3.68
	4.21	3.23
Media	4.06	3.74
Sesgo (%)	8	

Al resultar el sesgo menor del 10%, la difusión reversa puede considerarse despreciable [32]. La diferencia encontrada entre las masas captadas por las dos series de muestreadores, debida a la difusión reversa, representa el sesgo máximo que puede encontrarse en una atmósfera real no constante [32]. Estos resultados indican que el adsorbente Carboxen/PDMS es adecuado para el contaminante estudiado.

Con los resultados obtenidos en el estudio de la adsorción competitiva (ver Apartado 1.2.8) se ha llevado a cabo un análisis de varianza. Los resultados de dicho análisis se muestran en la Tabla 3.18, donde se incluyen también las velocidades de captación por difusión medias obtenidas experimentalmente para cada compuesto por separado, al igual que aquellas obtenidas de las tres experiencias con los compuestos mezclados en distintas proporciones. Los resultados indican que, debido a que los valores de P son mayores que 0.05, no hay adsorción competitiva significativa entre tolueno y clorobenceno, en las condiciones estudiadas.

Tabla 3.18. Efecto de la adsorción competitiva. ANOVA.

Tolueno/Clorobenceno v:v (%)	U media Tolueno (ml/min)	U media Clorobenceno (ml/min)
10:90	2.18	2.51
50:50	2.21	2.69
90:10	2.11	2.76
100:0	2.12	
0:100		2.57

ANOVA para Tolueno					
	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	0.0530608	3	0.0176869	0.30	0.8238
Dentro de los grupos	2.05017	35	0.0585763		
Total (Corr.)	2.10323	38			

ANOVA para Clorobenceno					
	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	0.298017	3	0.0993389	2.24	0.1060
Dentro de los grupos	1.24393	28	0.0444262		
Total (Corr.)	1.54195	31			

El muestreador desarrollado se ha evaluado sometiéndolo a un ensayo de campo mediante la comparación de los resultados con los obtenidos con el muestreador difusivo de vapores orgánicos 3M como método de referencia, para lo que se analizaron once muestras tomadas por ambos métodos simultáneamente. En la Figura 3.12 se muestra un cromatograma obtenido del análisis de una muestra tomada con el muestreador estudiado en una estación de servicio. En la Figura 3.13 se muestran los resultados obtenidos por ambos métodos comparados mediante un análisis de regresión considerando los resultados obtenidos con el muestreador 3M-3500 como variable independiente. En la Figura 3.13 se incluye el valor estimado para cada coeficiente del análisis de regresión, el coeficiente de correlación, y el error estándar de las estimaciones. El valor del índice de correlación de 0.9993 indica que existe una fuerte correlación entre ambos procedimientos. Los límites de confianza, al 95% de nivel de significación, para la ordenada en el origen y la pendiente fueron [-0.0563, 0.0857] y [0.9536, 1.0092], respectivamente, que incluyen, tanto la ordenada en el origen como la pendiente, los valores *ideales* de 0 y 1 respectivamente, indicando que no se diferencian significativamente los resultados obtenidos por ambos métodos.

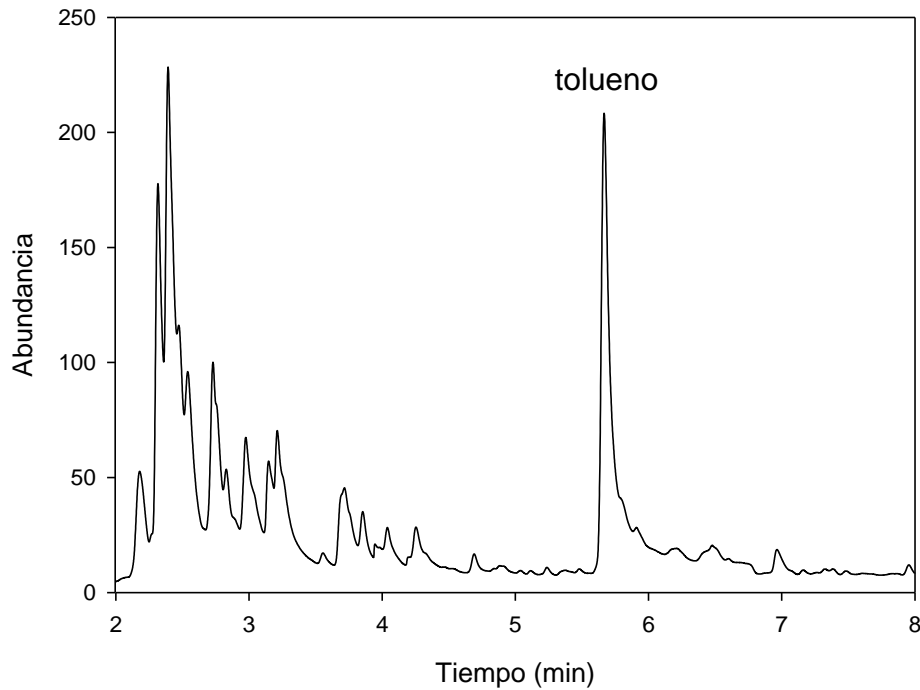


Figura 3.12. Cromatograma obtenido de una fibra expuesta durante 2 horas en una estación de servicio a una concentración de 0.19 mg/m^3

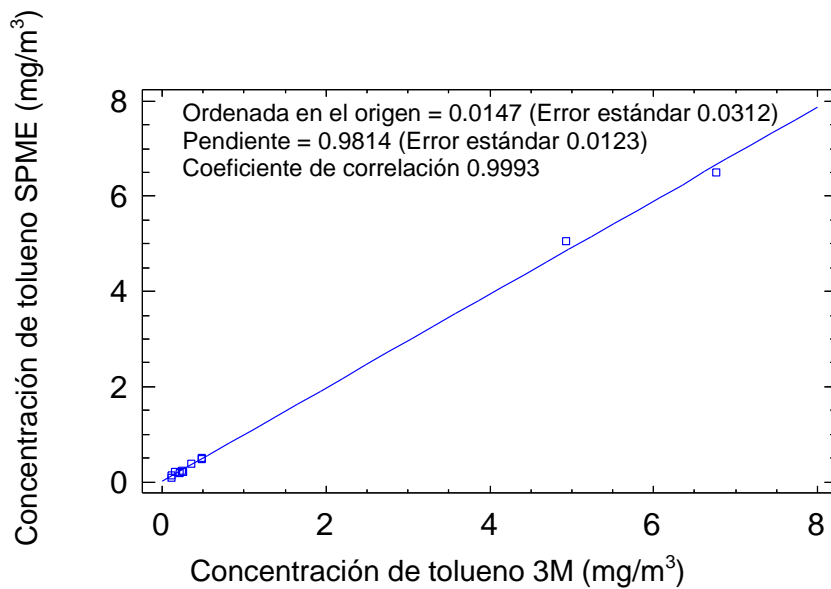


Figura 3.13. Correlación entre el tolueno ambiental determinado mediante los muestreadores difusivos 3M-3500 y SPME ($n = 11$).

3.4 Conclusiones

El nuevo muestreador por difusión descrito en este trabajo combina las ventajas de los muestreadores pasivos radiales con las ventajas de la técnica de SPME.

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar indican que el muestreador difusivo diseñado, basado en un prototipo de muestreador de SPME con una celda de difusión para obtener la difusión radial de los analitos, muestra buena respuesta tanto con concentraciones de vapor constantes como variables, siendo este último caso el más común en ambientes laborales.

Para tolueno y clorobenceno, la velocidad media de captación por difusión obtenida experimentalmente fue de 2.12 mL/min y 2.57 mL/min, respectivamente, y no se han observado efectos estadísticamente significativos de la concentración y el tiempo de muestreo, bajo las condiciones estudiadas. Se ha estudiado el efecto de la humedad relativa, la velocidad del aire y la adsorción competitiva y estos factores no presentan efectos estadísticamente significativos sobre la velocidad de captación por difusión. Sin embargo, la temperatura de muestreo sí tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la misma, no obstante, la concentración se puede medir correctamente una vez que el valor de la velocidad de captación por difusión a bajas temperaturas sea calculado de nuevo en estas condiciones.

La difusión reversa resulta despreciable por lo que la fibra Carboxen/PDMS resulta adecuada para el muestreo de VOC.

La muestra puede almacenarse hasta cuatro días a temperatura ambiente antes de ser analizada.

El estudio de campo realizado donde se comparan los resultados obtenidos por el dispositivo de muestreo pasivo estudiado basado en SPME y el muestreador pasivo de vapores orgánicos 3M-3500 ha demostrado que el muestreador desarrollado es adecuado para el muestreo por difusión de VOC.

Para el sevoflurano, la velocidad de captación por difusión media fue de 1.29 mL/min para las concentraciones habituales y un tiempo de exposición corto. No se observó que la concentración tuviera un efecto estadísticamente significativo sobre la velocidad de captación por difusión bajo las condiciones estudiadas por lo que puede ser utilizado para medir las concentraciones habituales de sevoflurano durante períodos cortos de exposición.

Los buenos resultados obtenidos en los métodos de toma de muestras y análisis desarrollados para tolueno, clorobenceno y sevoflurano son muy prometedores e indican que el nuevo diseño de muestreador pasivo, basado en SPME, puede proporcionar una herramienta muy útil para el control ambiental de la exposición laboral a contaminantes orgánicos.

3.5 Bibliografía

- [1] B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, *Critical Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 1.
- [2] G. Ouyang, J. Pawliszyn, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1059.
- [3] H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [4] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167.
- [5] S. Fustinoni, R. Giampiccolo, S. Pulvirenti, M. Buratti, A. Colombi, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 105.
- [6] S. Waidyanatha, Y. Zheng, S.M. Rappaport, *Chem. Biol. Interact.* 145 (2003) 165.
- [7] C. Prado, J. Garrido, J. Periago, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 255.
- [8] D. Poli, P. Manini, R. Andreoli, I. Franchini, A. Mutti, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 309.
- [9] C. Grote, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 587.
- [10] M. Guidotti, B. Onorati, E. Lucarelli, G. Blasi, G. Ravaioli, *Am. Clin. Lab.* 20 (2001) 23.
- [11] L.C.A. Amorim, Z.L. Cardeal, *J. Chromatogr. B* 853 (2007) 1.
- [12] J. Koziel, M. Jia, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5178.
- [13] F. Augusto, J. Koziel, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 73 (2001) 481.
- [14] L. Tuduri, V. Desauziers, J.L. Fanlo, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 49.
- [15] S. Isetun, U. Nilsson, A. Colmsjö, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 319.
- [16] S. Isetun, U. Nilsson, *Analyst* 130 (2005) 94.
- [17] A.F.L. Godoy, L. Van Vaeck, R. Van Grieken, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 331.
- [18] V. Larroque, V. Desauziers, P. Mocho, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 106.
- [19] B.D. Pacolay, J.E. Ham, J.R. Wells, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 275.
- [20] M. Hippelein, *Chemosphere* 65 (2006) 271.
- [21] P. A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 206.
- [22] P. A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1513.
- [23] A. Khaled, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 455.
- [24] Y. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6823.

- [25] F. Lestremau, F.A. Andersson, V. Desauziers, J.L. Fanlo, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2626.
- [26] C.-Y. Chen, C. Hsieh, J.-M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006)138.
- [27] R. Battle, A. Colmsjo, U. Nilsson, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 514.
- [28] S.-W. Tsai, S.-T. Tsai, V.-S. Wang, J.-S. Lai, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 25.
- [29] S.-W. Tsai, K.-Y. Kao, *J. Chromatogr. A* 1029 (2006) 29.
- [30] A. Accorsi, B. Morrone, I. Domenichini, S. Valenti, G. Raffi, F. Violante, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78 (2005) 369.
- [31] P. Sanabria, E. Rodríguez, E. Jiménez, M. A. Palomero, L. Goldman, F. Gilsanz, J. García, *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 53 (2006) 618.
- [32] UNE-EN 838. Exposición en el lugar de trabajo. Procedimientos de medida de gases y vapores que utilizan muestreadores por difusión. Requisitos y métodos de ensayo. AENOR, Madrid, 2010.
- [33] UNE-EN 100713. Instalaciones de acondicionamiento de aire en hospitales. AENOR, Madrid, 2005.
- [34] A. Berlin, R.H. Brown, K.J. Saunders (Eds), *Diffusive Sampling: An Alternative Approach to Workplace Air Monitoring*, CEC Pub. No. 10555EN. Commission of the European Communities, Brussels-Luxembourg, 1987.
- [35] C. Prado, J.F. Periago, I. Ibarra, J.A. Tortosa. *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 131.
- [36] S. Tumbiolo, J.F. Gal, P.C. María, O. Zerbinati, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 824.
- [37] S. Isetun, U. Nilsson, A. Colmsjö, R. Johansson, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1847.
- [38] "Improvements in Solid Phase Microextraction Fibers: Metal Fiber Cores Coupled with Automated Coating Process" R.E. Shirey and L.M. Sidisky. SUPELCO. Disponible en http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/t404050h1.Par.0001.File.tmp/t404050h1.pdf.
- [39] I.N.S.H.T. Protocolo de validación para la determinación de gases y vapores orgánicos en aire mediante su captación en muestreadores pasivos. MTA/PV-II(2)/98. INSHT, Madrid, 1998.
- [40] A. Accorsi, S. Valenti, A. Barbieri, G.B. Raffi, F.S. Violante, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76 (2003) 129.
- [41] C.-Y. Chen, C. Hsieh, J.-M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006)138.
- [42] H.C. Shih, S.W. Tsai, C.H. Kuo, *J. Occup. Environ. Hyg.* 9 (2012) 427.

- [43] T.S. Shih, H.-Y. Chang, H.-H. Liu, Y.-S. Hung, S.-H. Liou, J. Occup. Health 46 (2004) 479.
- [44] E. Langlois, Ann. Occup. Hyg. 52 (2008) 239.
- [45] "Radiello's manual" Fondazione Salvatore Maugueri. Clinica del lavoro e della riabilitazione. IRCCS. Disponible en <http://www.radiello.com/english/Radiello's%20manual%2001-06.pdf>.

Capítulo 4

APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN LA FRACCIÓN FINAL DE AIRE EXHALADO

4 APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN LA FRACCIÓN FINAL DE AIRE EXHALADO

4.1 Introducción

En los últimos años ha habido un interés creciente en la determinación de compuestos orgánicos volátiles presentes en el aire exhalado que puedan ser útiles como marcadores de enfermedades y también como marcadores de exposición en toxicología laboral [1-5].

Hay fundamentalmente dos tipos de muestras de aire exhalado, el aire exhalado mezclado y el aire exhalado final. El aire exhalado mezclado, que se obtiene durante una respiración normal siendo por tanto una mezcla de aire alveolar y aire procedente del volumen muerto del sistema respiratorio, puede utilizarse de forma cualitativa, con el fin de conocer la existencia de una exposición a un contaminante. La determinación cuantitativa de compuestos volátiles en el aire exhalado está considerada un buen procedimiento para estimar la dosis interna de un compuesto tóxico mediante control biológico, habiéndose establecido, tanto las bases teóricas, como los datos toxicocinéticos más relevantes [6]. Sin embargo, al tratarse de una muestra no homogénea, cuando se va a utilizar el aire exhalado para el control biológico se debe de identificar y recoger la porción de la muestra de aire exhalado que mejor refleje la concentración del disolvente en la sangre, es decir, el aire exhalado final o aire alveolar.

El muestreo de la fracción final de aire exhalado se puede llevar a cabo de un modo no invasivo y permite estimaciones válidas de la presión parcial del disolvente en la sangre arterial, dado el equilibrio existente entre el gas alveolar y la sangre arterial [7,8]. Sin embargo, la utilización del análisis del aire exhalado ha ido disminuyendo desde que se incorporó como índice de exposición biológica (BEI) por la American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH). Actualmente no se utiliza de forma rutinaria para el control de la exposición laboral. De hecho, de 42 índices de exposición biológica para 22 sustancias químicas propuestos por la ACGIH en 1990, 11 de ellos fueron para aire exhalado [9]. Mientras que en la actualidad, de

los 66 BEIs propuestos para 49 sustancias, tan sólo tres de ellos son para aire exhalado final [10]. Este uso limitado del análisis de aire exhalado se ha atribuido a una falta tanto de bases para la interpretación de datos como de metodología adecuada para la toma de muestra [11].

En una extensa revisión sobre los procedimientos, aplicaciones y limitaciones del muestreo de aire exhalado se señala que el desarrollo de métodos que incluyan la utilización de sistemas de toma de muestra con tubos adsorbentes, es decir una etapa de preconcentración, constituirá un avance importante para promover la utilización del análisis de aire exhalado [5,12]. En este sentido, se ha utilizado un diseño basado en un tubo Haldane-Priestley modificado, que permite recoger y atrapar la fracción final de aire espirado y concentrar alícuotas de aire exhalado de una o más exhalaciones en un tubo adsorbente relleno con carbón activo para una desorción química posterior [13], o con un adsorbente adecuado para una desorción térmica [14-16]. El sistema resultó idóneo para el control de n-hexano, tolueno, estireno e isoflurano en el aire exhalado, ya que se obtuvo buena correlación entre la exposición personal y el nivel de los biomarcadores, permitiendo calcular los límites de exposición biológica correspondiente a los límites ambientales [17-19].

La microextracción en fase sólida (SPME), en la que se utiliza una fibra de sílice fundida recubierta con una fase polimérica estacionaria, se ha aplicado al análisis de compuestos contaminantes medioambientales presentes en agua, matrices sólidas y, más recientemente, para el análisis de drogas en matrices biológicas [20-23]. SPME también se ha aplicado a la determinación de algunos constituyentes, como acetona, etanol e isopreno, en el aire exhalado [24-26].

En el presente trabajo se ha estudiado la aplicación de SPME para llevar a cabo el control biológico de compuestos orgánicos mediante su análisis en la fracción final de aire exhalado. Se ha enfocado el estudio en el tetracloroetileno (un disolvente utilizado en tintorerías y en operaciones de limpieza del metal) debido a que la capacidad de los humanos de metabolizar el tetracloroetileno es limitada, sólo el 1-3% de la cantidad de tetracloroetileno absorbida se metaboliza a ácido tricloroacético, siendo la cantidad restante excretada sin modificar en el aire exhalado. Este hecho convierte al tetracloroetileno en un buen ejemplo de compuesto que se elimina por vía respiratoria. Este compuesto, además, es interesante porque es de los pocos compuestos que tienen valor límite biológico en la fracción final de aire exhalado. Con el fin de ampliar a otros hidrocarburos aromáticos el campo de aplicación del método desarrollado, también se han estudiado otros compuestos como benceno, tolueno y

xileno, estos dos últimos, ampliamente utilizados en la fabricación de pinturas, colas o adhesivos, desengrasantes, agentes limpiadores, en la producción de polímeros y plásticos. La exposición a estos tres compuestos también puede encontrarse en las estaciones de servicio ya que forman parte de la composición de la gasolina. Se ha llevado a cabo un estudio de campo del sistema de medida en estaciones de servicio.

4.2 Experimental

4.2.1 Estudios en atmósfera controlada

La determinación de la curva de calibrado para cada uno de los compuestos hace necesaria la preparación de mezclas de gases patrón de compuestos orgánicos en aire, lo que requiere la generación de atmósferas controladas con diferentes concentraciones de los contaminantes. El sistema utilizado para generar la atmósfera patrón, ilustrado en la Figuras 4.1 y 4.2, se ha descrito previamente [27, apartado 3.2.2]. El sistema consiste en un método dinámico basado en una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) que proporciona una velocidad de flujo constante del compuesto mediante el movimiento del émbolo de una jeringuilla (Hamilton), cuyo contenido se inyecta a través de un septum pasando a la corriente de aire comprimido limpio donde se evapora.

La concentración de la atmósfera generada se comprobó mediante muestreadores activos que consistían en tubos de carbón activo conectados a la atmósfera a través de una bomba de aspiración. En todos los casos la concentración medida con los tubos de carbón activo ha coincidido con la concentración teórica calculada a partir del flujo de aire y la velocidad de la jeringuilla en un 10% [28].

La humedad de la atmósfera se ha ajustado haciendo pasar la corriente de aire a través de un borboteador, con agua en su interior, que se encontraba en un baño a una temperatura de 50°C. Se ha utilizado una humedad relativa de 98-100% para todos los experimentos, ya que este es el valor esperado en el aire exhalado.

El dispositivo utilizado para recoger las muestras de aire exhalado, que se muestra en la Figura 4.3, consiste en un bulbo de vidrio de 125 ml de volumen provisto de dos válvulas de cierre en ambos extremos. Uno de los extremos permite el uso de una boquilla desechable. Este bulbo de vidrio se acopla al sistema de generación de

atmósferas a través de una válvula, tal y como se muestra en la Figura 4.1 y en la Figura 4.2. Siguiendo este esquema se simuló la obtención de muestras con distintas concentraciones de tetracloroetileno (Merck), benceno (Merck), tolueno (Fluka) y xileno (Merck) en el aire exhalado.

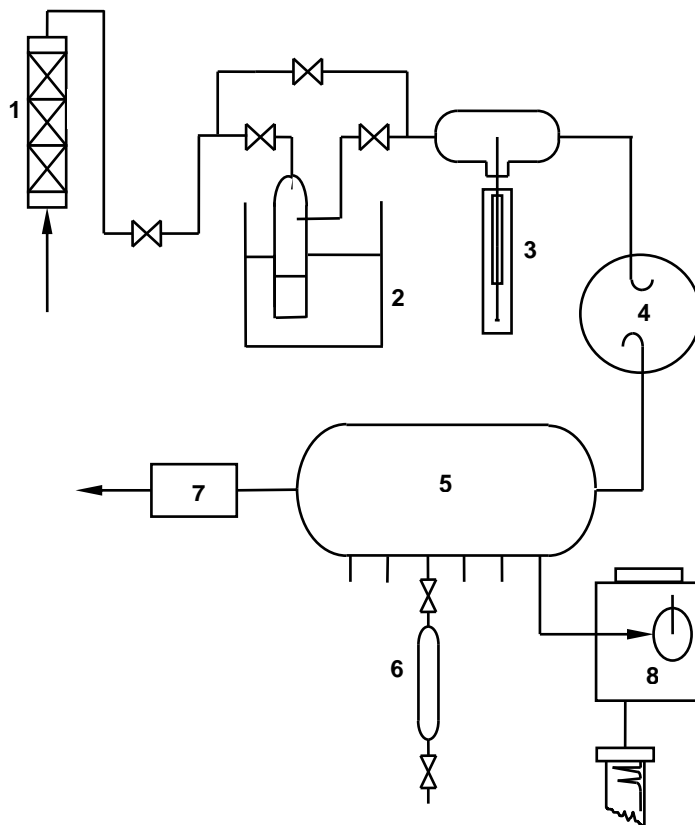


Figura 4.1. Esquema del sistema utilizado para generar la atmósfera controlada. 1 = filtro; 2 = humidificador; 3 = inyector automático; 4 = cámara de mezclado; 5 = cámara de toma de muestra; 6 = dispositivo de toma de muestra de aire exhalado; 7 = sensor de humedad; 8 = cromatógrafo de gases.

Se comprobó que la concentración de la atmósfera se mantuviera estable durante los ensayos realizados mediante un cromatógrafo de gases conectado en línea, ya que el coeficiente de variación resultó menor del 4 % en todos los casos. Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes niveles de concentración de tetracloroetileno (entre 2 y 35 mg/m³) por un lado, y de benceno (entre 0.03 y 6.23 mg/m³), tolueno (entre 0.11 y 12.25 mg/m³) y xileno (entre 0.11 y 12.09 mg/m³) simultáneamente por otro. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.



Figura 4.2. Sistema utilizado para generar la atmósfera controlada.



Figura 4.3. Dispositivo de toma de muestra de aire exhalado.

La preparación de atmósferas patrón y la toma de muestra se realizan en habitaciones separadas del laboratorio analítico. Para cada ensayo, el tubo de vidrio se conecta a la atmósfera, dejando pasar corriente de aire contaminado durante un minuto. Después el tubo se cierra y se analiza. Posteriormente, se pasa aire limpio a través del tubo, quedando así acondicionado para una nueva toma de muestras. A modo de control, se recogen muestras blanco y se analizan de la misma forma.

4.2.2 Muestras de aire exhalado en trabajadores expuestos

Las muestras de aire exhalado se toman en un área separada del lugar de la exposición. Dichas muestras se obtienen haciendo que el trabajador realice dos o tres respiraciones profundas, después inhale y mantenga la respiración durante 10-15 segundos, para que, posteriormente, exhale dentro del bulbo de vidrio con las válvulas abiertas (Figura 4.4). Al final de la exhalación se cierran las dos válvulas, por lo que queda una alícuota de la fracción final del aire exhalado en el bulbo. A continuación se procede a la microextracción y la fibra se transporta al laboratorio para su posterior análisis.



Figura 4.4. Toma de muestra de aire exhalado.

Las muestras de tetracloroetileno se obtuvieron de un trabajador expuesto en una tintorería, mientras que las de benceno, tolueno y xileno se obtuvieron de un grupo de 16 trabajadores expuestos en varias estaciones de servicio. Las muestras se tomaron al final de la jornada de trabajo de 8 horas, exceptuando alguna muestra de tetracloroetileno, tomada al principio de la misma. Los análisis se llevaron a cabo durante los meses más cálidos del año, junio, julio y septiembre, cuando tiene lugar una mayor exposición a estos compuestos [29]. Se estudió también la correlación existente entre los resultados obtenidos para benceno, tolueno y xileno, con las muestras ambientales personales obtenidas simultáneamente mediante muestreador difusivo 3M-3500 (Figura 3.5), suministrado por 3M España.

4.2.3 Método SPME y análisis GC-MS y GC-FID

Para la microextracción se han utilizado dos tipos de fibra. En un principio se utilizó la fibra de 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) para la determinación de tetracloroetileno por tratarse del recubrimiento más útil y conocido hasta ese momento, recomendado para la determinación de compuestos volátiles. El otro tipo de fibra, utilizada para la determinación simultánea de benceno, tolueno y xileno, fue la de 75 μm de PDMS/Carboxen, disponible comercialmente a partir de 2003, y diseñada para retener fuertemente disolventes y gases altamente volátiles, con la capacidad de extraer un rango de analitos de forma simultánea. Tanto los dispositivos de SPME, como las fibras de 100 μm PDMS y de 75 μm de PDMS/Carboxen fueron suministrados por Supelco. Con el fin de eliminar los posibles contaminantes de las fibras, estas se acondicionaron siguiendo las especificaciones del fabricante, es decir, las fibras de PDMS se acondicionaron en el inyector del GC a 250 °C durante una hora, mientras que las fibras de PDMS/Carboxen se acondicionaron a 300 °C durante al menos 30 minutos.

La fibra de SPME se introduce dentro del bulbo de vidrio a través de un septum de silicona (ver Figura 4.5) y se mantiene en contacto con la muestra de aire contaminado durante un minuto en todos los casos, es decir, tanto para el tetracloroetileno, como para el benceno, tolueno y xileno. Se pone especial cuidado en asegurar que la longitud de la aguja que atraviesa el septum sea siempre la misma. Después de la extracción, la fibra se introduce en la aguja, se extrae del bulbo y posteriormente se inyecta en el GC (Figura 1.7).

La desorción de percloroetileno se ha llevado a cabo en un cromatógrafo de gases HP 6890 Plus (Hewlett-Packard) acoplado a un detector selectivo de masas MSD HP 5973 (Hewlett-Packard). Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 4.1. La desorción de benceno, tolueno y xileno se ha llevado a cabo en un cromatógrafo de gases 6890N Network System (Agilent Technologies) acoplado a un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones cromatográficas se muestran en la Tabla 4.2.

En el inyector se utilizó un micro sello Merlin. Las condiciones de desorción descritas han dado lugar a una completa desorción tanto del tetracloroetileno, como del benceno, tolueno y xileno, lo que se comprobó con una segunda desorción de la fibra. Se utilizó un inserto desactivado (0.75 mm i.d. Supelco).

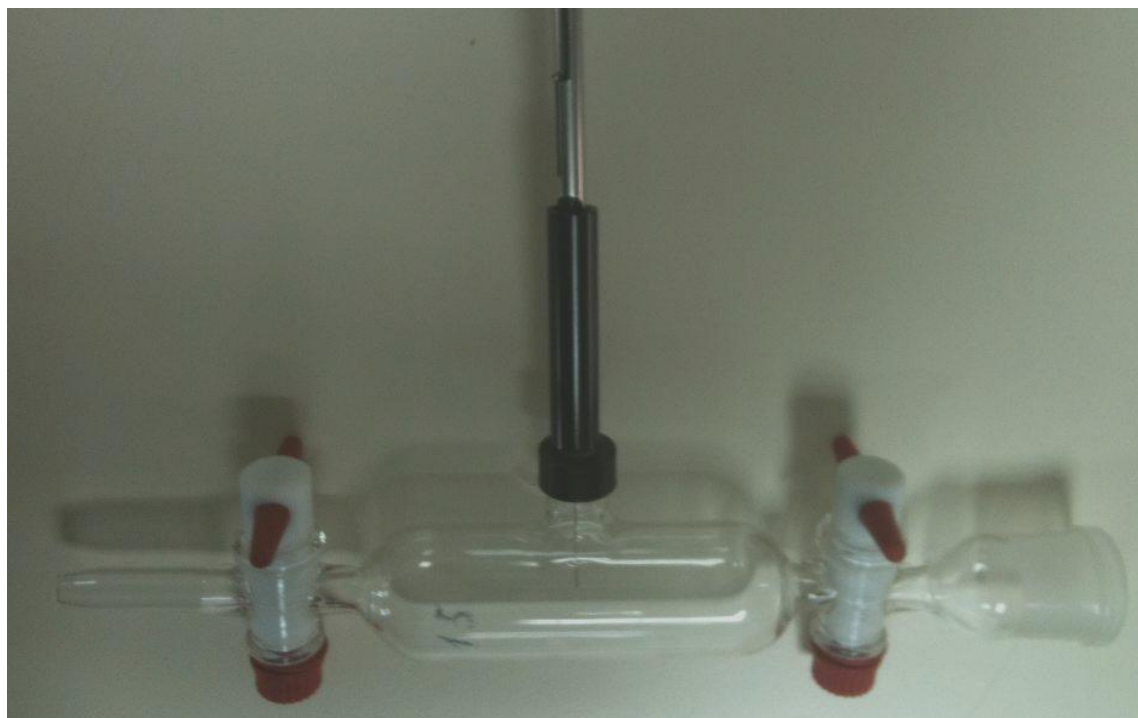


Figura 4.5. SPME de la muestra de aire exhalado.

Tabla 4.1. Condiciones de operación del GC-MS utilizadas en la determinación de Percloroetileno. Fibra PDMS.

	GC HP6890 Plus
Columna	HP1MS (50mx0.25mmI.D.x1µm)
Gas portador	Helio
Tipo de inyector	Split-splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	2 min
Tª del inyector	200°C
Presión en cabeza de columna	22.97 psi
Flujo de purga de septum	20 ml/min
Flujo en columna	1.2 ml/min
Tª del detector	280°C
	MSD HP 5973
Modo de ionización	EI
Voltaje del multiplicador	1364.7 V
Tª de la trampa de iones	230°C
Rango de masas	20-250 <i>m/z</i>
Velocidad de escaneado	5.98 scan/seg
Corriente de emisión del filamento	70 V
Programa de Temperaturas	
Tª inicial	35°C
Tiempo inicial	2 min
Rampa de temperatura	15°C/min
Tª final	160°C
Tiempo final	0 min
Tiempo total del análisis	10.3

Tabla 4.2. Condiciones de operación del GC-FID utilizadas en la determinación de benceno, tolueno y xileno. Fibra PDMS/Carboxen.

6890N	
Columna	HP5 (30mx0.32mmI.D.x0.25µm)
Gas portador	Helio
Gas de llama	Nitrógeno
Tipo de inyector	Split-splitless
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de purga	5 min
Tª del inyector	300°C
Presión en cabeza de columna	15.99 psi
Flujo de purga de septum	16.90 ml/min
Flujo en columna	4.2 ml/min
Flujo de gas auxiliar	45 ml/min
Temperatura del detector	270°C
Flujo Hidrógeno	40 ml/min
Flujo aire	450 ml/min
Programa de Temperaturas	
Tª inicial	35°C
Tiempo inicial	5 min
Rampa de temperatura	45°C/min
Tª final	180°C
Tiempo final	2.40 min
Tiempo total del análisis	10.62 min

El tiempo de retención del tetracloroetileno fue de 9.5 minutos. Los tiempos de retención con FID fueron de 1.82 minutos para el benceno, 3.27 para el tolueno y de 5.91 para el xileno.

La optimización de los parámetros del Espectrómetro de Masas (autotune) se llevó a cabo diariamente mediante autocalibración con perfluorotributilamina (PFTBA). Antes de comenzar los análisis se realizaron siempre blancos de la fibra para asegurar que no hubiera contaminación que pudiera interferir eluyendo al mismo tiempo que los compuestos de interés.

La desorción química del contaminante recogido en el muestreador pasivo 3M-3500 se llevó a cabo durante una hora en disulfuro de carbono (Panreac). Posteriormente se analizó en el cromatógrafo de gases Agilent 6890N con FID. La columna utilizada fue una columna capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y con 0.25 µm de espesor de película (J&W Scientific). La temperatura del horno se mantuvo a 35°C durante 5 min, después se aumentó a 3°C/min hasta los 73°C. El helio fue el gas utilizado como gas portador a un flujo constante de 1.6 ml/min. Se instaló un inserto (4 mm I.D., Agilent Technologies). Se trabajó con división de flujo (25:1, 40.6 ml/min).

4.2.4 Comparación con otro procedimiento de toma de muestra de la fracción final de aire exhalado

Se ha utilizado otro procedimiento de toma de muestra de la fracción final de aire exhalado para comparar los resultados con los obtenidos con el método desarrollado utilizando SPME. El sistema se ha validado y se ha utilizado previamente para la determinación de tolueno [13,14], n-hexano [17] e isoflurano [19], y puede verse en la Figura 4.6. Consiste en un tubo Haldane-Priestley modificado que posibilita que la fracción final del aire exhalado quede retenida en el interior de un tubo de aluminio calorifugado. El sistema permite tomar alícuotas de ese aire mediante una jeringuilla de gases (50 ml) impulsada por un servomotor. Posteriormente la muestra se conduce hacia el interior de un tubo relleno con un adsorbente. Las alícuotas pueden tomarse de una o de varias exhalaciones, lo que permite concentrar la muestra en el adsorbente. Se utilizaron tubos adsorbentes rellenos de Tenax TA.

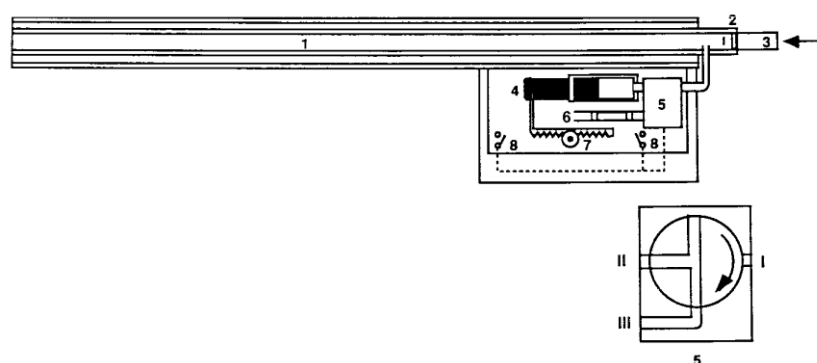


Figura 4.6. Esquema del sistema de captación de aire exhalado. (1) Tubo de aluminio calorifugado; (2) válvula antirretroceso; (3) tubo de cartón desechable; (4) jeringa; (5) válvula de tres vías; (6) tubo adsorbente; (7) motor; (8) interruptores finales de carrera.

El muestreador se acopló al sistema de atmósferas controladas a través de una válvula, de la misma forma que se ha descrito para el caso del bulbo de vidrio. Los ensayos se llevaron a cabo a tres niveles de concentraciones distintas de tetracloroetileno, 2, 4 y 10 mg/m³. El volumen total de tetracloroetileno que pasó a través del tubo adsorbente fue de 500 ml. La humedad relativa se mantuvo al 98-100%. Los tubos adsorbentes se desorbieron con un sistema de desorción térmica

ATD 50 de Perkin-Elmer, directamente conectado a un cromatógrafo de gases 8700 de Perkin-Elmer mediante una línea de transferencia caliente. Las condiciones de operación se encuentran resumidas en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Condiciones experimentales para la desorción térmica y cromatografía de gases. (FID= Detector de ionización de llama).

Parámetros de la desorción térmica	
Gas portador	N ₂ (68.95 kPa, 10 p.s.i.)
Desorción	7 min
Temperatura del horno	230°C
Trampa fría:	
Temperatura baja	-30°C
Temperatura alta	240°C
Temperatura de la línea de transferencia caliente	120°C
Parámetros de la cromatografía de gases	
Columna	FFAP (25 m x 0.2 mm x 03 µm)
Temperatura del horno	Isotermo, 90°C
Temperatura del detector	280°C
Detección	FID

4.3 Resultados y discusión

En las Tablas 4.4 y 4.5 se muestran los resultados del estudio de repetibilidad realizado sobre la determinación de la concentración de tetracloroetileno en el aire exhalado simulado mediante GC-MS y utilizando fibra PDMS, y de la concentración de benceno, tolueno y xileno mediante GC-FID utilizando fibra de Carboxen-PDMS. Para cada compuesto, se llevaron a cabo medidas repetidas extrayendo el compuesto en bulbos de vidrio obtenidos de la una atmósfera generada a una determinada concentración. La repetibilidad se evaluó calculando la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (RSD) de los valores observados. Los valores de RSD

para medidas realizadas en un mismo día fueron satisfactorios y menores del 7% en todos los casos, lo que refleja no sólo la precisión del muestreo y del método analítico sino también la homogeneidad de la atmósfera generada.

Tabla 4.4. Repetibilidad (como RSD) de la determinación de tetracloroetileno a diferentes niveles de concentración utilizando fibra PDMS y mediante GC/MS.

Concentración de Tetracloroetileno (mg/m ³)	Área de pico (TIC)	RSD (%)
2	636611	6.2
	619817	
	578476	
	622122	
	638811	
	700116	
4	1168335	7.0
	1070886	
	1041117	
	1146982	
	1266787	
	1168335	
8	2816327	4.9
	2827183	
	3127662	
	2743660	
	2941583	
	2793675	

DER: Desviación estándar relativa (%); TIC: cromatograma del ión total.

En la Tabla 4.6 se muestra el resultado del cálculo de la precisión de la determinación de tetracloroetileno teniendo en cuenta la repetibilidad entre diferentes días. Cada valor se obtuvo tomando la muestra de una atmósfera controlada diferente que se generó en varios días distintos, por lo que las concentraciones son sólo aproximadamente las mismas. El valor de RSD, que también refleja la precisión entre días de la generación de atmósferas, es similar a aquellos encontrados para métodos que utilizan SPME para la determinación de acetona, etanol e isopreno en aire exhalado [24], de isopreno en aire exhalado [25], y de etanol en sangre y orina [30]. También es similar a los valores encontrados para métodos que utilizan tubos

adsorbentes para captar tolueno y n-hexano presentes en el aire exhalado [13], y para determinar isoflurano y estireno en aire exhalado [14], lo que indica que la precisión para dichas muestras es lo suficientemente fiable como para proporcionar valores representativos.

Tabla 4.5. Repetibilidad (como RSD) de la concentración de benceno, tolueno y xileno a diferentes niveles de concentración. GC-FID. Fibra PDMS/Carboxen.

Benceno (mg/m ³)	Área de pico	RSD (%)	Tolueno (mg/m ³)	Área de pico	RSD (%)	Xileno (mg/m ³)	Área de pico	RSD (%)
3	560.8	5.2	6	1290.3	6.0	6	1183.5	5.9
	518.5			1110.0			1022.2	
	596.4			1245.3			1162.0	
	548.7			1180.6			1095.1	
	593.6			1302.1			1174.4	
	562.2			1194.1			1067.7	
5	824.6	5.9	10	1865.6	6.4	10	1745.6	6.9
	873.4			1881.8			1742.4	
	818.9			1702.2			1533.6	
	943.0			2040.0			1859.7	
	889.7			1899.9			1750.7	

RSD: Desviación estándar relativa (%).

Tabla 4.6. Precisión de la determinación de tetracloroetileno en días distintos.

Concentración de tetracloroetileno (mg/m ³)	Área de pico (TIC)	RSD (%)
3.9	1168335	12.2
4.0	1364800	
3.9	1016095	
4.1	1042721	
3.9	938258	
3.9	1187659	
3.9	1019908	
3.8	1176931	

RSD: Desviación estándar relativa (%); TIC: Cromatograma de iones totales.

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de aire exhalado simuladas tomadas de la atmósfera de concentraciones conocidas de los distintos contaminantes se han utilizado para la obtención de las curvas de calibrado. Como ejemplo, se muestra en la Figura 4.7 la recta de calibrado obtenida para tetracloroetileno donde se representa el área del pico correspondiente al cromatograma de iones totales en función de la concentración de la atmósfera de tetracloroetileno. El rango de concentración estudiado corresponde con el esperado en trabajadores expuestos. Cada nivel de concentración se ha medido en un día distinto y cada punto representa la media aritmética de, al menos, tres muestras diferentes tomadas de la atmósfera patrón de una determinada concentración. La curva refleja buena respuesta de linealidad en todo el rango estudiado. Los parámetros de las ecuaciones de las rectas, junto con los límites de detección obtenidos se muestran en la Tabla 4.7. Los límites de detección se calcularon a partir de la desviación residual estándar [31].

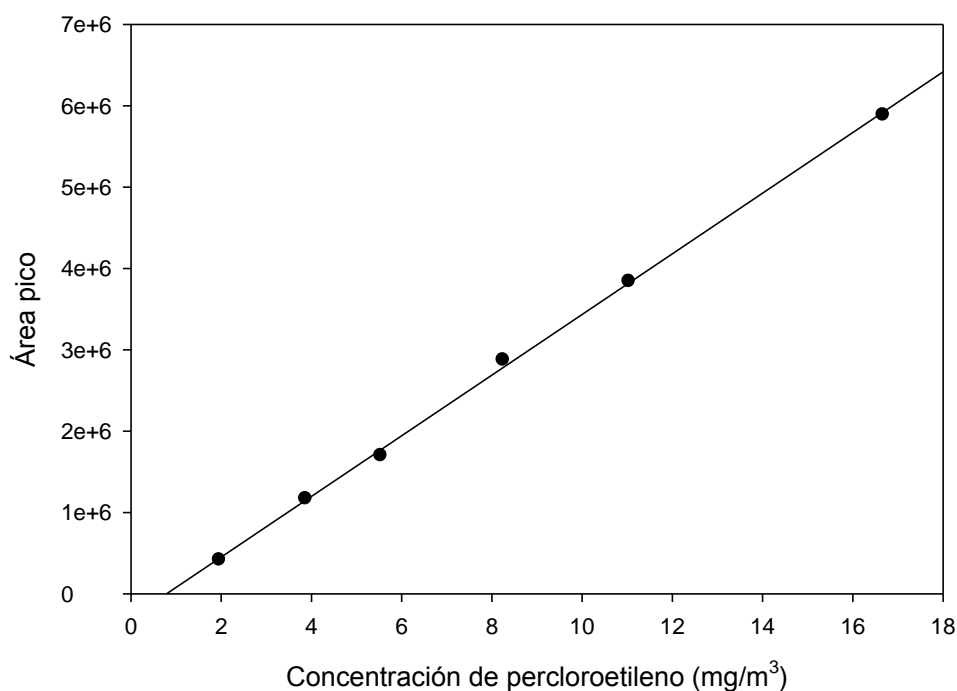


Figura 4.7. Recta de calibrado tetracloroetileno.

Tabla 4.7. Rectas de regresión, coeficientes de correlación entre el área de pico y la concentración en la muestra, y límites de detección.

	Recta: $y = a + bx$	r	LD (mg/m^3)
Tetracloroetileno	$y = -292930 + 372804x$	0.9992	0.51
Benceno	$y = 1.40 + 182.17x$	0.9999	0.04
Tolueno	$y = 27.64 + 197.69x$	0.9999	0.19
xileno	$y = 12.07 + 184.34x$	0.9999	0.17

x concentración (mg/m^3)

y área del pico (TIC)

r Coeficiente de correlación

LD límite de detección

Con las condiciones de toma de muestra y analíticas descritas, se puede cuantificar el tetracloroetileno en aire exhalado a concentraciones aproximadamente unas 40 veces más bajas que el índice biológico de exposición para la fracción final de aire exhalado propuesto por la ACGIH para este compuesto de $20.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ [10]. Además, el valor del límite de detección está muy por debajo de la concentración mínima de percloroetileno en aire exhalado obtenida en un estudio realizado en un establecimiento de limpieza en seco ($6.9 - 41.4 \text{ mg}/\text{m}^3$) [32]. El límite de detección del benceno de $0.04 \text{ mg}/\text{m}^3$ permite detectar la concentración mínima encontrada en el aire exhalado de trabajadores expuestos a vapores de gasolina [33]. El valor del límite de detección de tolueno de $0.19 \text{ mg}/\text{m}^3$ está próximo a la concentración mínima encontrada en el aire exhalado de trabajadores de una fábrica química expuesta a tolueno [34]. Por lo tanto, el método desarrollado permite tanto el control biológico de la exposición de trabajadores que están expuestos a bajas concentraciones de estos compuestos como la detección de la acumulación de tetracloroetileno en tejidos grasos mediante la determinación de este compuesto en el aire exhalado después de que haya pasado algún tiempo desde la exposición [35]. El modo de monitorización selectiva de iones (SIM) puede también utilizarse para cuantificar el compuesto, lo que mejoraría notablemente los resultados analíticos, ya que la adquisición de datos con SIM puede dar, por ejemplo, un aumento en la sensibilidad de 20 veces su valor [36].

Debe señalarse que la utilización de la espectrometría de masas puede ser necesaria para identificar componentes constituyentes del aire exhalado para diagnósticos médicos o para la evaluación de la exposición ocupacional de mezclas complejas de compuestos que pueden interaccionar toxicológicamente. No obstante, el procedimiento puede simplificarse utilizando un detector FID para el control rutinario

de la exposición laboral a un compuesto o a un grupo de compuestos conocidos. A modo de ejemplo, la Figura 4.8 muestra un cromatograma obtenido del análisis de una muestra recogida en el bulbo de vidrio correspondiente a la concentración estudiada más baja, de 1.9 mg/m^3 de tetracloroetileno, utilizando un detector FID.

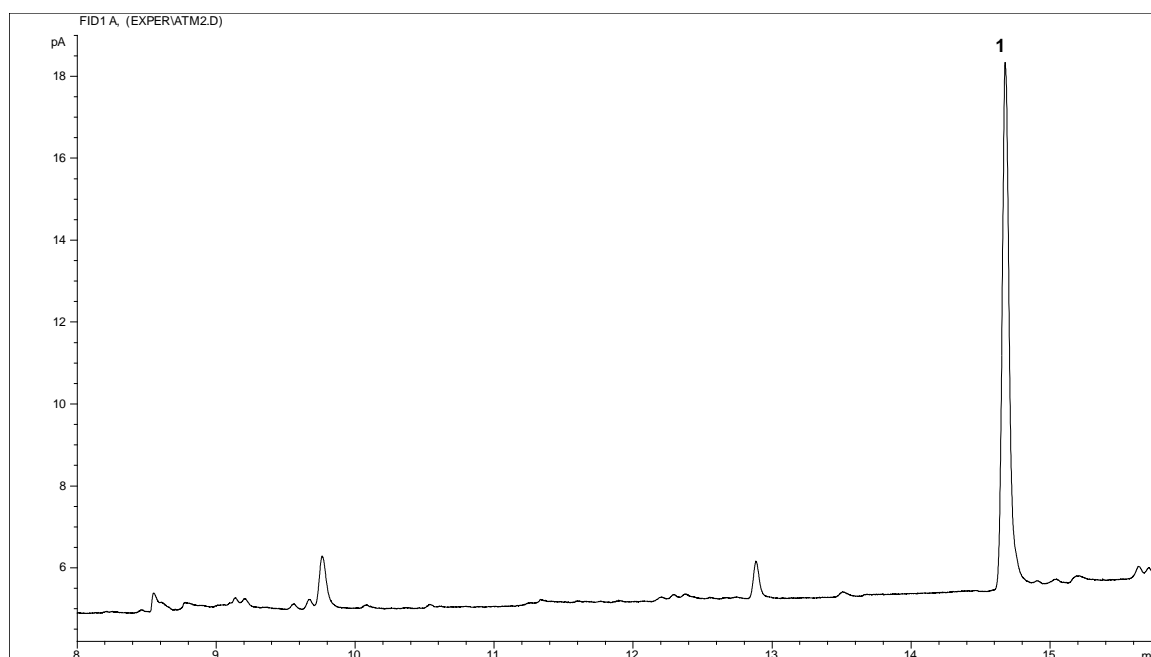


Figura 4.8. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra mediante SPME-GC-FID (atmósfera controlada de tetracloroetileno de concentración 1.9 mg/m^3). (1) Tetracloroetileno.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta al utilizar SPME para la toma de muestra de aire exhalado es el modo de almacenamiento de la muestra para asegurar la estabilidad de los analitos. Se ha comprobado que la utilización de la fibra de Carboxen-PDMS pinchada en un septum, una vez recogida la muestra, permite un almacenamiento de la misma, a temperatura ambiente, sin riesgo de una pérdida de muestra significativa, es decir, mayor del 5%, en los 60 min inmediatos a la toma de muestra.

Con el fin de llevar a cabo una comparación con otro método ya establecido, se analizaron muestras tomadas de la misma atmósfera de tetracloroetileno utilizando, tanto SPME, como el método de concentración con tubos de Tenax como adsorbente,

previamente descrito en la sección 4.2.4. En la Tabla 4.8 se muestran los resultados obtenidos por los dos métodos de muestreo y análisis de aire exhalado para tres niveles de concentración distintos de tetracloroetileno. Sobre estos resultados se ha llevado a cabo un análisis de varianza para cada concentración, con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre los dos métodos de toma de muestra y análisis, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.9. Estos resultados indican que, debido a que los valores de P son mayores que 0.05, no se encuentran diferencias significativas, a un nivel de confianza del 95%, entre los resultados obtenidos mediante el procedimiento desarrollado y los obtenidos por el método de comparación, para las tres concentraciones de tetracloroetileno examinadas.

Tabla 4.8. Resultados de la comparación de métodos y la incertidumbre global para los tres niveles de concentración de tetracloroetileno.

Nivel de concentración (mg/m ³)	Concentración medida (mg/m ³)				Incertidumbre global ^a (%)	
	SPME		Tubos de Tenax		SPME	Tubos Tenax
1.93	2.33	2.04	1.97	2.22	22.5	20.7
	2.18	2.04	2.23	2.12		
	2.03	2.14	2.12	2.00		
3.85	3.68	4.56	4.05	3.76	21.8	10.6
	3.87	3.59	4.11	3.88		
	3.64	3.47	3.64	3.98		
9.69	10.51	9.95	9.39	9.71	16.7	5.4
	10.58	8.38	9.33	9.35		
	10.12	9.55	9.47	9.46		

^a $\frac{|\bar{\chi} - \chi_{\text{verdadero}}| + 2s}{\chi_{\text{verdadero}}} \cdot 100$, donde $\bar{\chi}$ es el valor medio de las medidas, $\chi_{\text{verdadero}}$ es la concentración verdadera de la atmósfera, s es la desviación estándar de las medidas.

Los resultados de la incertidumbre global también se muestran en la Tabla 4.8, expresada, en términos relativos, como una combinación de sesgo y precisión [37], a la vista de los cuales, podemos afirmar que los resultados obtenidos por el método

propuesto y el método de comparación son similares. La incertidumbre global resultó también similar a la obtenida por el método de NIOSH para la determinación de tetracloroetileno en aire exhalado mediante GC portátil [38].

Tabla 4.9. Análisis de los datos experimentales. Análisis de varianza para el tetracloroetileno.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Nivel de significación
C = 1.93 mg/m³					
Entre métodos	8.33x10 ⁻⁴	1	8.33x10 ⁻⁴	0.07	0.803 ^{NS}
Entre concentraciones	0.127133	10	0.0127133		
Total	0.127967	11			
C = 3.85 mg/m³					
Entre métodos	0.0310083	1	0.0310083	0.33	0.5776 ^{NS}
Entre concentraciones	0.936017	10	0.0936017		
Total	0.967025	11			
C = 9.69 mg/m³					
Entre métodos	0.472033	1	0.472033	1.39	0.2659 ^{NS}
Entre concentraciones	3.39837	10	0.339837		
Total	3.8704	11			

NS = no significativo al 95% de confianza.

La toma de muestras y el método utilizando SPME, tal y como se describe aquí, se ha aplicado a la determinación de tetracloroetileno presente en las muestras de aire exhalado de un trabajador expuesto en una tintorería, y a la determinación de benceno, tolueno y xileno de las muestras de aire exhalado de un grupo de trabajadores expuestos a dichos compuestos presentes en los vapores de gasolina en estaciones de servicio. A diferencia de otros sistemas de recogida de aire alveolar, el trabajador no necesita una formación especial para proporcionar muestras de la fracción final de aire exhalado [4,12,39], e incluso la muestra podría recogerla el propio trabajador [40]. En la Figura 4.9 se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis de muestras recogidas antes y después de una exposición a tetracloroetileno. En la Figura 4.10 se ilustra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos de las

muestras recogidas después de una jornada de 8 horas de un trabajador expuesto a benceno, tolueno y xileno en una estación de servicio. El tiempo requerido para llevar a cabo la toma de muestra y el análisis descrito es menor de 11 minutos, que es menor que el requerido utilizando S_2C para la desorción química o el método de desorción térmica.

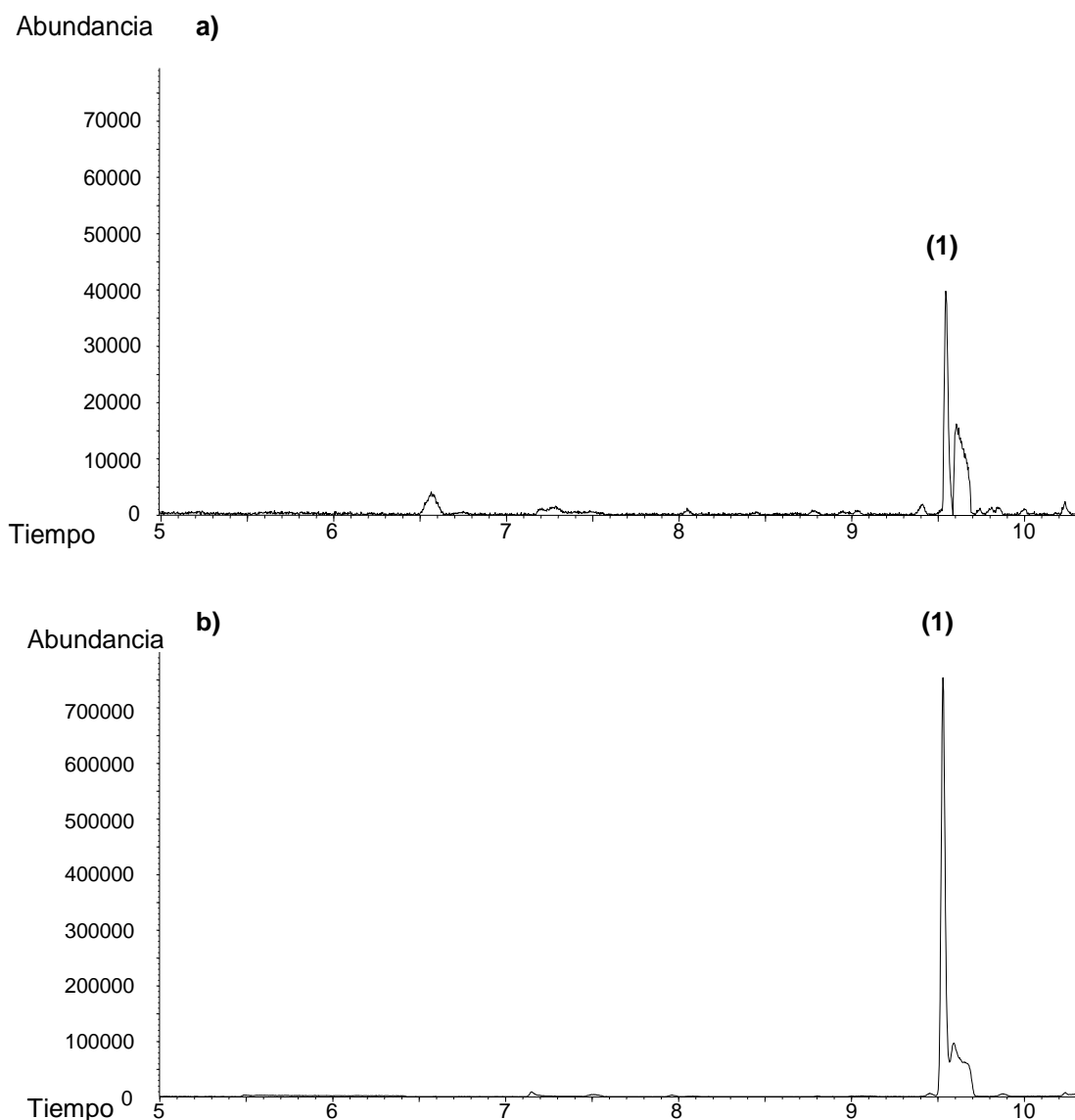


Figura 4.9. Cromatograma del ión total obtenido del análisis del aire exhalado de una persona expuesta a tetracloroetileno. (a) Recogida 16 h después de la exposición, antes de la exposición (3 mg/m^3) (b) después de la exposición (26 mg/m^3). (1) Tetracloroetileno.

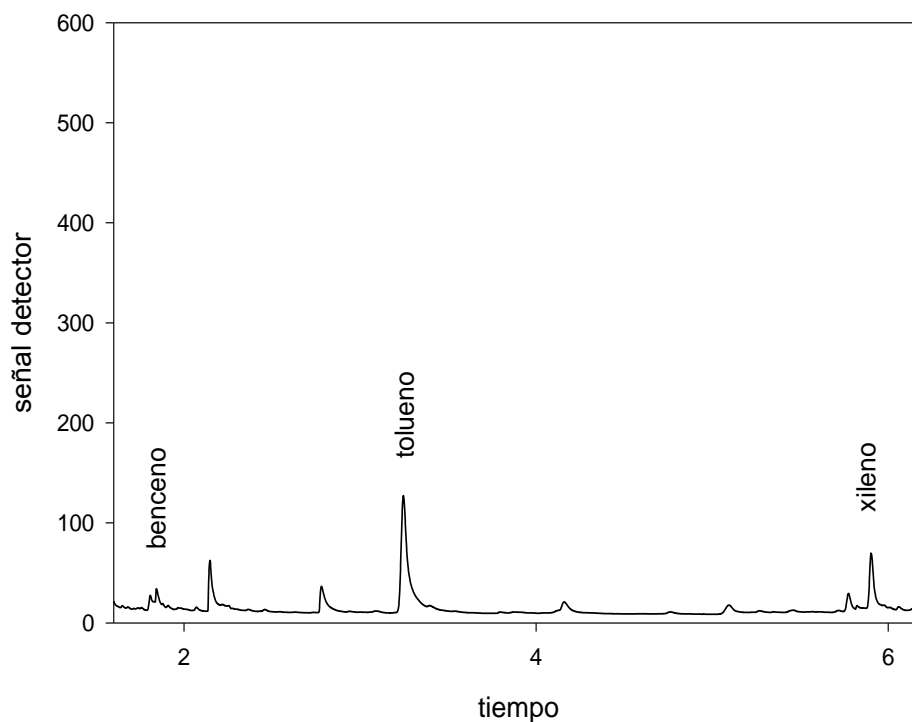


Figura 4.10. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de aire exhalado de un sujeto laboralmente expuesto a benceno, tolueno y xileno, tomada al final de la jornada de 8 horas de trabajo ($64.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de benceno, $1597.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de tolueno y $586.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de xileno).

En la Tabla 4.10 se muestran las concentraciones alveolares resultantes para el tetracloroetileno. Destaca la presencia de un nivel relativamente alto de tetracloroetileno en la muestra de aire exhalado tomada 16 h después de la exposición (Figura 4.8.a), posiblemente debido al hecho de que el tetracloroetileno tiende a acumularse en los tejidos grasos, por lo que, en la exposición diaria repetida tiene lugar una acumulación progresiva del disolvente en el organismo [41].

En la Tabla 4.10 también se aprecia la buena concordancia entre los resultados obtenidos después de tres extracciones consecutivas de la misma muestra, es decir, insertando la fibra de nuevo en la misma muestra de aire exhalado recogida. Esto tiene un interés particular ya que ofrece la ventaja de poder realizar análisis repetidos de una misma muestra, hecho que difiere del método de análisis que utiliza un adsorbente para atrapar los contaminantes con posterior desorción térmica, ya que, en

este último caso se pierde toda la muestra una vez que se analiza. Además, esta característica permitiría la utilización de recubrimientos de fibra distintos dependiendo de la polaridad de los analitos a extraer de una misma muestra, cuestión en la que deberían centrarse futuras investigaciones.

Tabla 4.10. Resultados de la concentración de tetracloroetileno en la fracción final de aire exhalado de un trabajador expuesto.

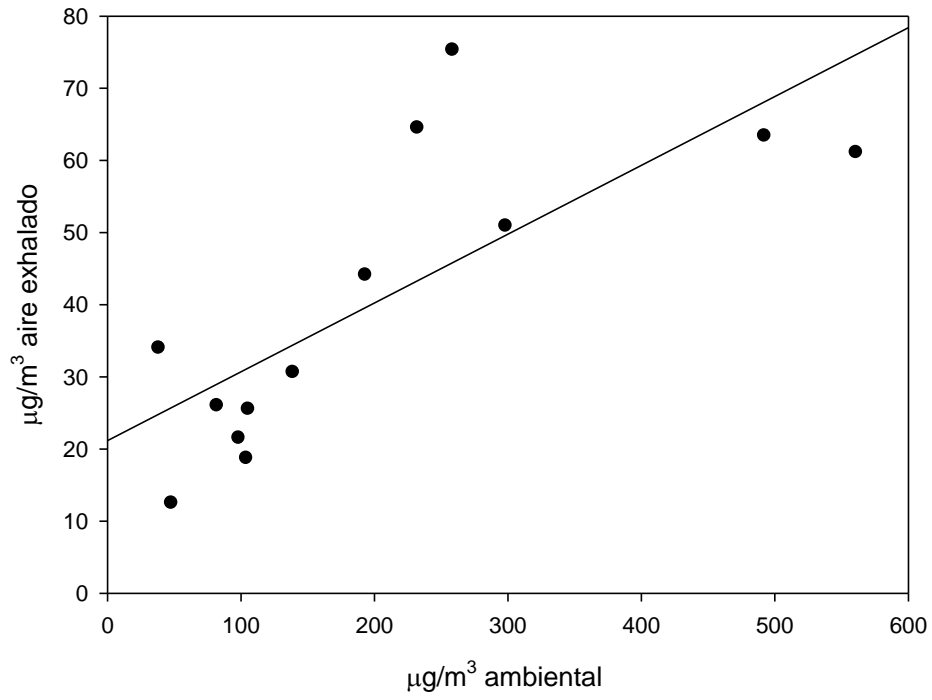
	Concentración (mg/m ³)
– Tetracloroetileno en la fracción final de aire exhalado antes de la exposición	3.4
– Tetracloroetileno en la fracción final de aire exhalado después de la exposición	25.8
2 ^a extracción	26.0
3 ^a extracción	27.1

El estudio del comportamiento de campo del método estudiado se ha realizado mediante la determinación de la correlación existente entre los resultados de las concentraciones alveolares para benceno, tolueno y xileno de los trabajadores expuestos a vapores de gasolina en las estaciones de servicio, y las concentraciones ambientales determinadas mediante muestreo personal con captador pasivo de vapores orgánicos 3M-3500.

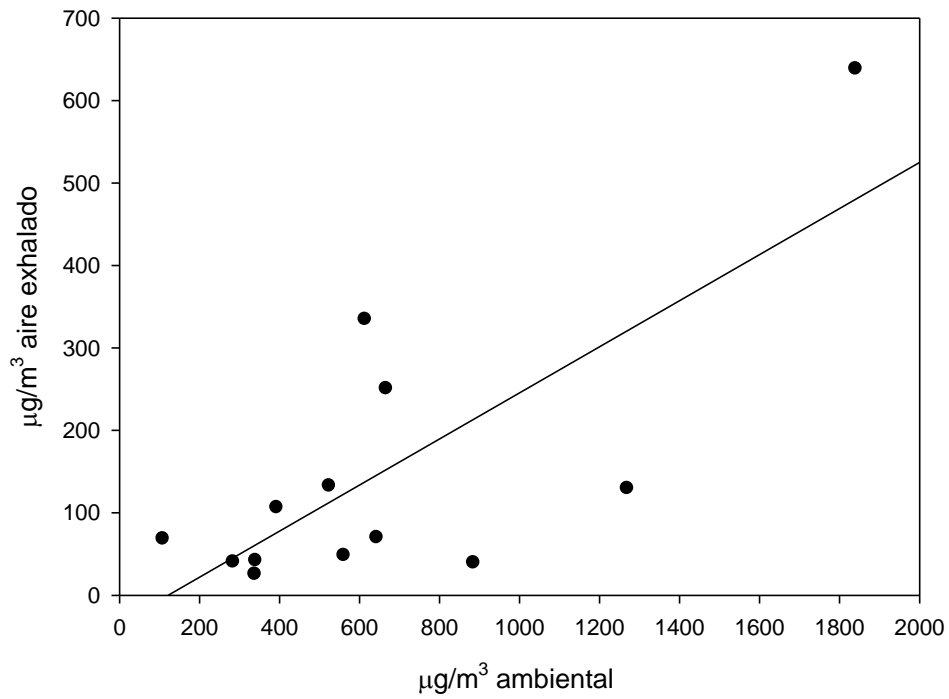
En la Figura 4.11 se muestra la correlación existente entre la concentración de cada uno de los analitos de interés en el ambiente, tomando las muestras mediante muestreador pasivo 3M, y la concentración de dichos analitos en el aire exhalado.

En la Tabla 4.11 se muestran los resultados del análisis de regresión realizado.

(a) Benceno



(a) Tolueno



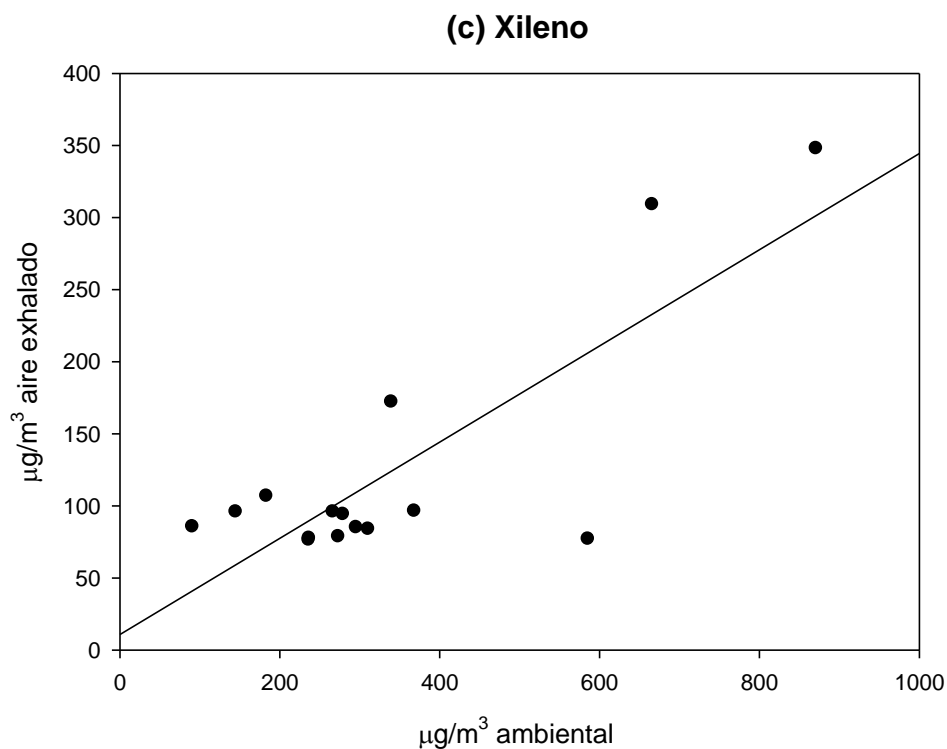


Figura 4.11. Correlación existente entre la concentración de cada analito en el aire exhalado y la concentración de cada analito en el ambiente. (a) Benceno, (b) tolueno y (c) xileno.

Tabla 4.11. Correlaciones entre la concentración de cada analito en el aire exhalado y su concentración ambiental ($y = a + bx$).

y	x	a	b	n	r	Valor P
Benceno en aire exhalado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Benceno ambiental ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	21.16	0.095	13	0.765	<0.01
Tolueno en aire exhalado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Tolueno ambiental ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	-33.84	0.279	13	0.746	<0.01
Xileno en aire exhalado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Xileno ambiental ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	10.80	0.334	14	0.811	<0.001

a: ordenada en el origen, b: pendiente, r: coeficiente de correlación, n: número de trabajadores.

Los resultados indican que hay una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de benceno, tolueno y xileno en el aire exhalado y la concentración de estos compuestos en el ambiente al 99% de confianza ($P < 0.01$). El valor del coeficiente de correlación es comparable al obtenido por Ghittori y sus

colaboradores en un estudio realizado a 36 trabajadores expuestos a tolueno en una fábrica química ($r=0.822$) [34]. A partir de la ecuación de regresión obtenida se obtiene una concentración de 20 mg/m^3 de tolueno en el aire exhalado para una concentración ambiental del VLA de 192 mg/m^3 . Este valor se asemeja bastante al obtenido en el estudio realizado por Periago y sus colaboradores sobre la correlación entre el tolueno exhalado y el ambiental donde la población estudiada es mayor [18].

4.4 Conclusiones

La microextracción en fase sólida puede resultar muy útil para el control biológico de compuestos orgánicos presentes en el aire exhalado de personas laboralmente expuestas. El método propuesto en este trabajo, que podría también ser aplicado a otros compuestos orgánicos volátiles, combina la toma de muestras de aire alveolar utilizando un bulbo de vidrio con la extracción mediante SPME de los compuestos presentes en dicha fracción, permitiendo, de este modo, la cuantificación de compuestos orgánicos volátiles en el aire exhalado.

El método estudiado resulta preciso, lineal y sensible en el rango de concentraciones de interés para el campo ocupacional. Además, el procedimiento analítico aquí descrito no utiliza disolventes, por lo que resulta simple, rápido y altamente reproducible.

La ventaja que el método ofrece cuando se compara con otros que apuntan al mismo objetivo, incluyendo el método basado en la concentración con un adsorbente y posterior desorción térmica, es simplificar el procedimiento de captación y análisis evitándose la necesidad de complejos equipos para la toma de muestras de la fracción de aire alveolar, y de la instrumentación adicional para la desorción térmica.

El método propuesto proporciona una herramienta práctica y fiable para el control biológico rutinario de la exposición laboral a compuestos volátiles en estudios de higiene industrial.

4.5 Bibliografía

- [1] M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greeberg, R.N. Cataneo, J. Chromatogr. B 729 (1999) 75.
- [2] J.k. Schubert, K.H. Spittler, G. Braun, K. Geiger, J. Guttmann, J. Appl. Physiol. 90 (2001) 486.
- [3] W.H. Cheng, W.J. Lee, J. Lab. Clin. Med. 133 (1999) 218.
- [4] A.B. Lindstrom, J.D. Pleil, Biomarkers 7 (2002) 189.
- [5] M. Alonso, J.M. Sánchez, TrAC 44 (2013) 78.
- [6] V. Fiserova-Bergerova, Ann. Occup. Hyg. 34 (1990) 639.
- [7] G.R. Kelman, Br. J. Ind. Med. 39 (1982) 259.
- [8] H.K. Wilson, Scan. J. Environ. Health 12 (1986) 174.
- [9] American Conference of Governmental Industrial Hygienist. Threshold limit values (TLVs) for chemical substances and physical agents and biological exposure indices (BEIs). ACGIH, Cincinnati, Ohio, USA, 1990.
- [10] American Conference of Governmental Industrial Hygienist. Threshold limit values (TLVs) for chemical substances and physical agents and biological exposure indices (BEIs). ACGIH, Cincinnati, Ohio, USA, 2012.
- [11] P.O. Droz, M.P. Guillemin, J. Occup. Med. 28 (1986) 593.
- [12] H.K. Wilson, A.C. Monster, Occup. Environ. Med. 56 (1999) 753.
- [13] J.F. Periago, A. Luna, A. Morente, A. Zambudio, J. Appl. Toxicol. 12 (1992) 91.
- [14] J.F. Periago, C. Prado, I. Ibarra, J. Tortosa, J. Chromatogr. A 657 (1993) 147.
- [15] C. Prado, J.F. Periago, A. Sepúlveda-Escribano, J. Chromatogr. A 719 (1996) 87.
- [16] C. Lourencetti, C. Ballester, P. Fernández, E. Marco, C. Prado, J.F. Periago, J.O. Grimalt, Anal. Chim. Acta 662 (2010) 23.
- [17] J.F. Periago, A. Cardona, D. Marhuenda, J. Roel, M. Villanueva, J. Martí, A. Luna, Int. Arch. Occup. Environ. Health 65 (1993) 275.
- [18] J.F. Periago, A. Morente, M. Villanueva, A. Luna, J. Appl. Toxicol. 14 (1994) 63.
- [19] C. Prado, J.A. Tortosa, I. Ibarra, A. Luna, J.F. Periago, J. Appl. Toxicol. 17 (1997) 179.
- [20] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 65 (1993) 1843.
- [21] W.M. Coleman III, J. Chromatogr. Sci. 35 (1997) 245.
- [22] H.L. Lord, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 3899.
- [23] X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, J. Chromatogr. Sci. 35 (1997) 302.
- [24] C. Grote, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 587.

- [25] R. Hyšpler, S. Crhová, J. Gaspariĉ, Z. Zadák, M. Čížková, V. Balasová, J. Chromatogr. B 739 (2000) 183.
- [26] M. Guidotti, B. Onorati, E. Lucarelli, G. Blasi, G. Ravaili, Am. Clin. Lab. 20 (2001) 23.
- [27] C. Prado, I. Ibarra, J.F. Periago, J. Chromatogr. A 778 (1997) 255.
- [28] UNE-EN 838. Exposición en el lugar de trabajo. Procedimientos de medida de gases y vapores que utilizan muestreadores por difusión. Requisitos y métodos de ensayo. AENOR, Madrid, 2010.
- [29] J.F. Periago, A. Zambudio, C. Prado, J. Chromatogr. A 778 (1997) 263.
- [30] X.P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, H. Seno, A. Ishii, O. Suzuki, Chromatographia 47 (1998) 593.
- [31] J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware, USA, 1993.
- [32] N.D. Sweet, G.E. Burroughs, L. Ewers, G. Talaska, J. Occup. Environ. Hyg. 1 (2004) 515.
- [33] L.C.A. Amorim, J.P. Carneiro, Z.L. Cardeal, J. Chromatogr. B 865 (2008) 141.
- [34] S. Ghittori, A. Alessio, S. Negri, L. Maestri, P. Zadra, M. Imbriani, Ind. Health 42 (2004) 226.
- [35] P.O. Droz, M.M. Wu, W.G. Cumberland, M. Berode, Br. J. Ind. Med. 46 (1989) 447.
- [36] F.L. Cardinali, D.L. Ashley, J.V. Wooten, J.M. McCraw, S.W. Lemire, J. Chromatogr. Sci. 38 (2000) 49.
- [37] EN 482. Workplace atmospheres: General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents. EC, Bruselas, 1994.
- [38] National Institute of occupational Safety and Health, Manual of Analytical Methods (NMAM), 4th ed, NIOSH, Washington, DC, 1998.
- [39] R.A. Glaser, J.E. Arnold, S.A. Shulman, Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 51 (1990) 139.
- [40] P. Egeghi, L. Nylander-French, K.K. Gwin, I. Hertz-Picciotto, S.M. Rappaport, Ann. Occup. Hyg. 46 (2002) 489.
- [41] R. Lauwerys, Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales, Masson, S.A., Barcelona, España. 1994.

Capítulo 5

DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE CETONAS (ACETONA, METILETILCETONA Y METILISOBUTILCETONA) Y TETRAHIDROFURANO EN ORINA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

5 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE CETONAS (ACETONA, METILETILCETONA Y METILISOBUTILCETONA) Y TETRAHIDROFURANO EN ORINA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

5.1 Introducción

Con el objetivo de evaluar la exposición ocupacional de manera fiable, el control biológico resulta muy útil como complemento al control ambiental porque tiene en cuenta diferentes variables que pueden afectar a la exposición y que el control ambiental no tiene, como son la posibilidad de exposición por vía dérmica, diferencias en la absorción individual y el uso o efectividad de los equipos de protección individual [1], permitiendo, de este modo, la cuantificación de la exposición global. A la hora de elegir el tipo de fluido biológico que se utilizará, se prefiere la toma de muestra de orina a la de sangre ya que no se necesita una preparación especial, no es invasiva y las muestras son más estables [2].

La excreción urinaria de disolventes sin metabolizar, tales como acetona, metiletilcetona (MEK) y metilisobutilcetona (MIBK) es un indicador muy sensible y específico de la exposición a bajos niveles y a mezclas de estos disolventes ya que se han encontrado correlaciones positivas entre los niveles en orina de estos compuestos orgánicos volátiles (VOC) y sus respectivos niveles en aire [1,3,4]. La concentración de THF sin metabolizar en orina también es un indicador biológico muy útil de la exposición laboral a este compuesto [4,5].

Los compuestos mencionados, acetona, MEK y MIBK, se utilizan principalmente como disolventes en la aplicación de recubrimientos protectores a base de celulosa o resina (barnices) y adhesivos (pegamentos y cementos caucho). También se utilizan como disolventes en pinturas, tintes, gomas, grasas, aceites, ceras, resinas, caucho, plásticos y lacas. Además, se utilizan comúnmente para eliminar pinturas y barnices, en pinturas en spray, en diluyentes, en líquidos limpiadores, en la industria farmacéutica y como disolventes para extracciones [5-10]. El tetrahidrofurano (THF) se utiliza en adhesivos, pinturas, barnices, y como disolvente para resinas [5]. En la mayoría de sus aplicaciones, uno o varios de estos compuestos aparecen juntos, como componentes de tintes, y de disolventes, imprimadores y

cementos solventes para tuberías de plástico, de ahí la importancia de encontrar un método capaz de analizar estos compuestos simultáneamente.

Tanto la American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) como el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo (INSHT) han asignado un índice de exposición biológica para cada cetona [10,11]. El INSHT incluyó en 2011 un VLB para THF de 2 mg/l [11], además este compuesto tiene la notación “vía dérmica”, lo que indica que en su caso va a ser particularmente importante la utilización del control biológico para evaluar adecuadamente la exposición.

El método de espacio de cabeza (HS) unido a la cromatografía de gases (HS-GC) ha sido el método tradicionalmente recomendado para la determinación de acetona, MEK, MIBK y THF en orina [5], siendo, además, el método adoptado más utilizado por las agencias medioambientales para determinar VOC en matrices sólidas y líquidas [12]. Este método se aplica en una amplia variedad de campos [13], entre los que se encuentra el control biológico de la exposición ambiental y ocupacional de acetona y disolventes orgánicos mediante su determinación en orina [13,14]. Cuando se acopla a espectrometría de masas (HS-GC-MS) resulta muy útil para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo y se ha utilizado con éxito para la determinación de compuestos orgánicos en agua [15-17] y en fluidos biológicos [18-20], incluyendo la determinación de acetona en éstos últimos [21]. Su principal desventaja es que los equipos automatizados disponibles en el mercado suponen un alto coste por lo que no todos los laboratorios pueden disponer de ellos.

Una de las técnicas de toma y preparación de muestra más utilizadas hoy en día es la microextracción en fase sólida (SPME) debido a sus muchas ventajas. Entre ellas se encuentra que se trata de un método de preparación de muestra sin disolventes, es económicamente accesible para cualquier laboratorio y permite simultáneamente el muestreo, la extracción, la concentración y la introducción del analito en un cromatógrafo de gases en un solo paso [22,23]. Esta técnica está basada en la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra hacia el recubrimiento de una fibra de sílice fundida, donde quedan retenidos mediante absorción o adsorción. Si el recubrimiento es un polímero líquido como PDMS, el proceso que tiene lugar es una disolución y los analitos se retienen mediante absorción. Mientras que si se trata de un recubrimiento mixto con sólido poroso, el proceso que tiene lugar es un fenómeno superficial donde los analitos se retienen mediante adsorción. Posteriormente, los analitos se desorben térmicamente desde la fibra a la columna capilar del GC directamente a través del puerto de inyección.

En el análisis de muestras biológicas, con el fin de reducir las interferencias propias de la matriz y alargar la vida de la fibra, resulta muy útil la utilización de la técnica de espacio de cabeza unida a la SPME, que proporciona mayores sensibilidades en comparación con HS convencional debido a que tiene lugar una concentración previa del analito en el revestimiento de la fibra [24]. Dicha técnica, acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), es una potente herramienta para el análisis cualitativo y cuantitativo, altamente específico, que se ha utilizado con éxito para la determinación de compuestos orgánicos en fluidos biológicos [25-38].

La extracción mediante SPME depende de muchos factores, que pueden actuar simultáneamente, entendiéndose como factor cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento [39]. Entre los factores que pueden afectar a la eficiencia de SPME se encuentran el tipo de fibra, el tiempo de equilibrio o incubación, la temperatura y el tiempo de extracción, y la presencia o ausencia de sales. Estas variables deben optimizarse para asegurar recuperaciones adecuadas. El diseño experimental es una herramienta muy útil para determinar qué variables influyen más sobre una respuesta -la cantidad extraída, en este caso- en qué proporción, y el efecto de la interacción entre ellas, dando a conocer los valores óptimos y permitiendo un considerable ahorro de tiempo [40].

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la aplicación de SPME al análisis simultáneo de acetona, MEK, MIBK y THF en orina. Una vez conocidas las condiciones óptimas, se ha calculado la precisión y el límite de detección del método con el fin de evaluar su utilidad en el control biológico de la exposición laboral a estos compuestos. Para estudiar su comportamiento, el método desarrollado se ha comparado con un método que utiliza una técnica automática basada en HS, cuyo uso está muy extendido. Finalmente, también se ha estudiado el comportamiento del método mediante la participación en un programa externo de intercomparación (German External Quality Assessment Scheme, G-EQUAS), para el análisis toxicológico de materiales biológicos, uno de los controles externos de aseguramiento de la calidad más conocidos, organizado por la Sociedad Alemana de Medicina Ocupacional y Ambiental.

5.2 Experimental

5.2.1 *Reactivos y preparación de patrones*

Los reactivos químicos, acetona, THF y metanol, se adquirieron a través de Fluka mientras que MEK y MIBK fueron suministrados por Merck.

La disolución patrón de cetonas y THF se preparó en metanol, proporcionado por Fluka, y se almacenó a 4°C. Los patrones de trabajo, para el análisis mediante SPME, se prepararon a diario mediante dilución de la disolución patrón con agua ultra-pura obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q. Volúmenes apropiados de esta disolución patrón de trabajo se añadieron a 2.5 ml de orina procedente de personas no expuestas a estos contaminantes. Se analizaron blancos de orina con el fin de comprobar que no había interferencias con los analitos de interés.

Los patrones para el análisis mediante HS-GC-MS se prepararon mediante la adición de distintas cantidades de la disolución patrón de cetonas y THF en metanol, en 2 ml de agua de alta pureza. No se han observado diferencias entre trabajar con patrones preparados en orina y en agua.

5.2.2 *Método SPME y condiciones del análisis cromatográfico*

La muestra de orina a la que se le adiciona un volumen apropiado de la disolución patrón de trabajo se puso en un vial de 5 ml con forma cónica (ver Figura 5.1). La sal estudiada fue cloruro sódico (NaCl, suministrado por Merck) y la agitación de la muestra, para aumentar la velocidad de equilibrio entre la fase acuosa y la de vapor, se llevó a cabo con agitadores magnéticos de forma triangular. El vial se introdujo en un baño de agua termostático para poder seleccionar las diferentes temperaturas estudiadas, y durante los diferentes tiempos de equilibrio (tiempos de incubación), antes de proceder a la extracción.

La fibra se expuso al espacio de cabeza por encima de la orina, durante tiempos en el rango de uno a veinte minutos. Se asegura que la longitud de la aguja que pasa a través del septum sea siempre la misma con el fin de que la distancia a la que la fibra queda expuesta al espacio de cabeza por encima de la muestra durante la

extracción, y también durante la desorción en el inyector, se mantenga siempre constante. Inmediatamente después la fibra se introduce en su aguja, se extrae del vial y se inserta en el inyector del GC para su análisis (ver Figura 1.7).

Se estudiaron dos tipos de fibra, una de 75 μm de Carboxen-Polidimetilsiloxano (Carboxen-PDMS) y la otra de 65 μm de PDMS-Divinilbenceno (PDMS-DVB), ambas proporcionadas por Supelco.



Figura 5.1. Toma de muestra mediante fibra SPME.

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con un inyector Split-Splitless que operó en modo splitless, con un tiempo de purga de cuatro minutos. Se utilizó un microsello Merlin en el puerto de inyección. Se instaló un inserto de inyección (0.75 mm I.D., Supelco). La temperatura del inyector fue de 250°C para la desorción de la fibra de PDMS-DVB y de 300°C para la de Carboxen-PDMS. Con un segundo análisis se comprobó que no quedaba analito retenido en la fibra. Se utilizó una columna capilar HP-1 (60m de longitud, 0.2 mm de diámetro interno) con 1 μm de espesor de fase (J&W Scientific). La temperatura inicial del horno se mantuvo a 40°C durante 4 minutos, después se aumentó a 20°C/min hasta 140°C, que se mantuvieron durante 2 minutos, con un tiempo total de análisis de 11 minutos, y con helio como gas portador a un flujo constante de 1.4 ml/min.

Se utilizó como detector un espectrómetro de masas Hewlett-Packard MSD 5973, trabajando en modo simultáneo de barrido (scan) de m/z 29 a m/z 300 y monitorización del ión seleccionado (SIM) a m/z 43 y 58 para acetona, m/z 43 y 72 para MEK, m/z 43, 58 y 85 para MIBK, y m/z 42 y 72 para THF. La fuente de ionización se mantuvo a 230°C. Los tiempos de retención para acetona, MEK, MIBK y THF fueron de 5.36, 7.27, 9.87 y 7.96 minutos, respectivamente. Diariamente se llevaron a cabo autotunes con perfluorotributilamina (PFTBA) al igual que desorciones de blancos de la fibra para asegurar que no existían compuestos que eluyeran al mismo tiempo que los compuestos de interés y, por lo tanto, que la desorción era completa.

Las muestras de orina recibidas del G-EQUAS se diluyeron cincuenta veces para que la concentración se encontrara en el rango estudiado, con el fin de evitar la saturación de la fibra.

5.2.3 *Condiciones del análisis mediante HS-GC-MS*

Para las experiencias realizadas mediante la técnica de espacio de cabeza se ha utilizado un analizador con trampa Perkin-Elmer TurboMatrix HS 40 Trap, provisto de un muestreador automático de espacio de cabeza. Las muestras se calentaron a 70°C durante 20 minutos con agitación y la temperatura de la aguja fue de 100°C. El tiempo de presurización fue de 1 minuto y la inyección de 0.01 minutos a 20 psig. La muestra pasó a través de la línea de transferencia a 150°C a un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Clarus 600 con una presión en la columna de 16 psig. El horno se mantuvo a 40°C durante 4 minutos y después se aumentó la temperatura hasta 90°C a 20 °C/min. La columna capilar utilizada fue HP-5MS (30m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno) con 0.25 μm de espesor de fase, J&W Scientific. El cromatógrafo lleva acoplado un espectrómetro de masas Perkin-Elmer Clarus 600 T MS, trabajando simultáneamente en modo scan y SIR (Selected Ion Recording), con condiciones similares a las del espectrómetro de masas utilizado en las experiencias realizadas con el método HS-SPME.

5.2.4 *Diseño experimental*

El estudio de los factores que influyen sobre la cantidad de analito extraída mediante SPME se realizó utilizando una disolución de 2 mg/l de MIBK como modelo de las tres cetonas.

Se ha evaluado la influencia del tipo de fibra sobre la cantidad de MIBK adsorbida, para lo que se eligieron dos tipos de fibra. Por un lado, la fibra de Carboxen-PDMS porque se ha demostrado con anterioridad que esta fibra da respuestas más altas para estos compuestos [24,35,37,38]; y por otro, la fibra de PDMS-DVB porque en relación a la sensibilidad ha resultado adecuada para el análisis de disolventes polares en matrices líquidas [41].

Otros factores estudiados han sido la temperatura de extracción en un rango de 20°C a 80°C y el tiempo de extracción en un rango de 5 a 20 minutos. Estos rangos se eligieron en función de los resultados obtenidos en otros estudios realizados mediante SPME sobre la determinación de acetona en sangre [35,36], de acetona y MEK en saliva [37], de MEK en orina [38], y de acetona, MEK, MIBK y THF en matrices acuosas [41].

Además, se ha evaluado la influencia de la adición de sal a la muestra de orina sobre la respuesta, ya que en algún caso se ha demostrado que las áreas de los picos aumentan significativamente mediante la adición de sal [36,38], debido a la influencia de la fuerza iónica sobre el coeficiente de partición entre la fase gaseosa y la líquida.

El tiempo de incubación es otro factor estudiado que puede influir sobre la cantidad extraída mediante SPME [25,37].

Se ha utilizado el diseño experimental para determinar los parámetros o factores experimentales, y sus interacciones, que puedan presentar efectos significativos sobre la eficiencia de la extracción.

Los factores más significativos se han obtenido a partir de un diseño factorial fraccionado, particularmente utilizado cuando hay muchos factores ya que permite una reducción en el número de análisis [40]. Se llevó a cabo un diseño factorial fraccionado de un diseño factorial 2^5 , designado como diseño factorial 2^{5-1} , para cinco variables a dos niveles, con dos experimentos centrales para estudiar los efectos individuales de estas variables [25]. Se llevaron a cabo dos bloques en diferentes días, por lo que se realizaron un total de 36 ensayos. El experimento realizado en dos bloques puede

proporcionar una precisión mayor que realizado en uno porque se elimina la diferencia entre bloques [42].

En la Tabla 5.1 se muestran los factores y los niveles estudiados de cada uno de ellos. La matriz del diseño experimental y la evaluación de los resultados obtenidos se realizó mediante la utilización del programa Statgraphics 5 Plus (Manugistics, 2000).

Tabla 5.1. Lista de factores sobre la respuesta de MIBK y los niveles estudiados en el diseño factorial.

Factores	Nivel 1 (-)	Nivel 2 (+)
A: Fibra	Carboxen/PDMS	PDMS/DVB
B: Temperatura (°C)	15	60
C: Tiempo incubación (min)	1	15
D: tiempo extracción (min)	1	15
E: Sal	0	1

La metodología de superficie de respuesta es un grupo de técnicas utilizadas en los estudios empíricos de las relaciones entre una respuesta y una serie de variables de control. Es útil para conocer qué valores de las variables de control producirán un máximo en una respuesta específica y cómo es la superficie de respuesta en las inmediaciones de este máximo.

Una vez encontrados los principales factores, los diseños compuestos centrales son útiles para obtener un modelo cuantitativo más detallado del sistema para su optimización, encontrando, de este modo, las mejores condiciones, es decir, predecir matemáticamente cómo se relaciona una respuesta con los valores de varios factores y sus interacciones mediante una función de segundo orden [40]. Los diseños

compuestos centrales son posiblemente los más utilizados para ajustar superficies de respuesta de segundo orden.

Para la realización del diseño compuesto central se utilizó la fibra de Carboxen/PDMS para una disolución de 10 mg/l de acetona, 1 mg/l de MEK y 2 mg/l de MIBK. Se aplicó un diseño compuesto central que consiste en una parte factorial, un diseño factorial 2^3 , para los tres factores que tienen una influencia significativa, a dos niveles, aumentado con dos puntos centrales y con una parte axial, un diseño estrella consistente en 6 puntos axiales. Se utilizaron dos bloques con el fin de asegurar la homogeneidad de las condiciones de trabajo, por lo que se llevaron a cabo un total de 32 ensayos.

Los factores y los niveles estudiados se muestran en la Tabla 5.2. El programa Statgraphics se utilizó para crear el diseño compuesto de segundo orden, procesar los resultados de las experiencias, obtener las ecuaciones que relacionan la cantidad extraída de cada cetona con los factores y sus interacciones, y adquirir las condiciones de extracción óptimas.

Tabla 5.2. Lista de factores sobre la respuesta de acetona, MEK y MIBK, y sus niveles estudiados para el diseño compuesto.

Factores	Nivel 1 (-)	Punto central (0)	Nivel 2 (+)
A: Temperatura (°C)	20	50	80
B: Tiempo de extracción (min)	5	10	20
C: Sal	0.2	0.6	1

5.2.5 Validación del método SPME

Una vez establecidas las condiciones óptimas, se ha llevado a cabo la validación del método.

El método se desarrolló inicialmente para las tres cetonas. Sin embargo, ya que el THF suele aparecer junto con estas cetonas y debido al reciente aumento en importancia de este compuesto (modificación del BEI del THF de 8 mg/l a 2 mg/l en 2009 y la adopción de un VLB (2 mg/l) en 2011), el THF se incluyó con posterioridad en la puesta a punto del método.

Se analizó una tanda de muestras de orina de personas no expuestas, a la que se le adicionó cetonas y THF, con las condiciones óptimas del método desarrollado de SPME.

Con objeto de evaluar la linealidad del método, se realizaron estudios de calibración para acetona, MEK, MIBK y THF.

También se calculó el límite de detección a partir de la desviación residual estándar [39] y se llevaron a cabo estudios de precisión. La precisión del método, en términos de repetibilidad (o precisión en un mismo día), expresada como la desviación estándar relativa (RSD), se ha evaluado utilizando alícuotas de orina tomadas de una muestra a la que previamente se le adicionó una cantidad conocida de acetona, MEK y MIBK, en 6 réplicas, a dos niveles de concentración dentro del rango de linealidad (1.17 y 3.95 µg/ml de acetona; 0.24 y 0.80 µg/ml de MEK; y 0.23 y 0.80 µg/ml de MIBK). La repetibilidad (calculada ahora entre distintos días) se obtuvo a partir de los resultados para 2 mg/l de MIBK obtenidos en ensayos realizados en 6 días distintos, expresada como RSD.

Con el objeto de evaluar el funcionamiento del método desarrollado, se compararon los resultados con los obtenidos mediante el método de HS descrito en el Apartado 5.2.3 y se participó en el programa externo de intercomparación, para el análisis toxicológico de materiales biológicos (G-EQUAS).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Diseño factorial fraccionado para la identificación de los factores

En la Tabla 5.3 se muestra la matriz de diseño con las condiciones de los ensayos obtenidas a partir del diseño factorial fraccionado llevado a cabo 2^{5-1} .

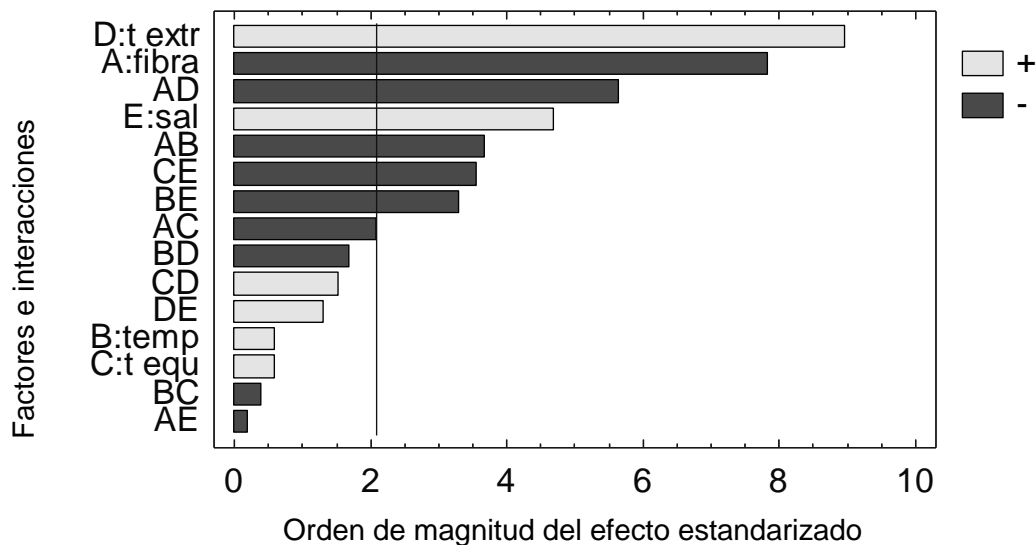
Tabla 5.3. Matriz del diseño factorial fraccionado.

Análisis	Fibra	T (°C)	$t_{inc}^{(a)}$ (min)	$t_{extr}^{(b)}$ (min)	Sal* (g)
1	Carboxen/PDMS	60	15	15	0
2	PDMS/DVB	15	1	15	1
3	PDMS/DVB	60	1	15	0
4	PDMS/DVB	60	15	1	0
5	Carboxen/PDMS	60	1	1	0
6	Carboxen/PDMS	15	15	1	0
7	PDMS/DVB	15	15	1	1
8	Carboxen/PDMS	15	1	15	0
9	Carboxen/PDMS	60	1	15	1
10	PDMS/DVB	15	1	1	0
11	Carboxen/PDMS	15	15	15	1
12	PDMS/DVB	15	15	15	0
13	PDMS/DVB	60	1	1	1
14	Carboxen/PDMS	15	1	1	1
15	Carboxen/PDMS	60	15	1	1
16	PDMS/DVB	37.5	8	8	0.5
17	Carboxen/PDMS	37.5	8	8	0.5
18	PDMS/DVB	60	15	15	1

(a) Inc.: incubación
 (b) Extr.: extracción
 0: Sin sal
 1 g: saturada
 0.5 g: no saturada

En el gráfico de Pareto (Figura 5.2) cada factor se representa por una barra horizontal, cuya longitud es proporcional al efecto estandarizado, que es el efecto estimado dividido por su error estándar. Mediante una línea vertical se define el límite de significación, considerándose significativos al 95% de confianza los factores cuyo efecto estandarizado supere dicha línea. Los efectos estadísticamente significativos son tres factores y cuatro interacciones. Los efectos están ordenados de mayor a menor importancia lo que permite identificar rápidamente los más importantes, que en este caso son el tiempo de extracción, el tipo de fibra, la presencia de sal y la interacción de los dos primeros y, en menor medida, la interacción de la temperatura con el tipo de fibra y con la presencia de sal, y la interacción del tiempo de equilibrio con la presencia de sal.

La recuperación de MIBK aumentó con la utilización de la fibra de Carboxen/PDMS, con el tiempo de extracción y la presencia de sal, coincidiendo con los resultados obtenidos en otros estudios realizados [24,38].



A: fibra PDMS/DVB:+ fibra Carboxen/PDMS:-
 B: Temperatura (°C)
 C: Tiempo de equilibrio (min)
 D: Tiempo de extracción (min)
 E: Sal

Figura 5.2. Efectos estimados de los factores estudiados y de sus interacciones sobre la cantidad de MIBK extraída.

A partir de los resultados de este primer paso, se eliminaron dos variables, el tiempo de incubación, o de equilibrio, que se fijó en un minuto, y el tipo de fibra, siendo la de Carboxen/PDMS la utilizada en los análisis posteriores. Tal y como puede observarse, la temperatura no afecta a la recuperación, pero, ya que su interacción con el tipo de fibra y con la presencia de sales sí contribuye a ella, se consideró esta variable para el diseño compuesto central.

5.3.2 *Diseño compuesto central*

La matriz del diseño compuesto central 2^3 aumentado con 6 puntos axiales y dos centrales se muestra en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Matriz del diseño compuesto central.

Análisis	T (°C)	t_{extr} (min)	Sal
1	50	5	0.6
2	20	5	1
3	80	12.5	0.6
4	80	5	0.2
5	80	20	1
6	80	20	0.2
7	50	12.5	0.2
8	20	12.5	0.6
9	50	20	0.6
10	20	20	1
11	50	12.5	0.6
12	80	5	1
13	20	20	0.2
14	50	12.5	0.6
15	20	5	0.2
16	50	12.5	1

Sobre los datos obtenidos del diseño se ha llevado a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los compuestos estudiados. En este análisis se descompone la variabilidad de la respuesta, en este caso la cantidad de analito extraída, en las contribuciones debidas a cada uno de los efectos y a sus interacciones. En la Tabla 5.5 se muestran los resultados de este análisis estadístico para acetona, los cuales indican que, al tener valores de P menores de 0.05, cinco

efectos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95.0%, destacando el tiempo de extracción, la sal y la interacción del tiempo de extracción con la temperatura como los efectos más significativos sobre la cantidad de acetona extraída.

Tabla 5.5. ANOVA de los datos obtenidos para acetona utilizando la RSM.

Factor	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: T	1.9947E16	1	1.9947E16	6.64	0.0176
B: t extr	4.76671E16	1	4.76671E16	15.86	0.0007
C: Sal	9.82422E16	1	9.82422E16	32.69	0.0000
AA	1.64072E16	1	1.64072E16	5.46	0.0295
AB	5.11853E16	1	5.11853E16	17.03	0.0005
AC	9.96378E15	1	9.96378E15	3.32	0.0829
BB	1.93185E14	1	1.93185E14	0.06	0.8023
BC	1.05439E16	1	1.05439E16	3.51	0.0751
CC	2.39636E15	1	2.39636E15	0.80	0.3820
bloques	1.78044E15	1	1.78044E15	0.59	0.4501
Error total	6.3117E16	21	3.00557E15		
Total (corr.)	3.22604E17	31			

R² = 80.4351%

Error estándar de la estimación = 5.48231E7

Error absoluto medio = 3.58064E7

F-ratio: Media de cuadrado factor/Media cuadrado error

En la Tabla 5.6 se muestran los resultados para MEK, a la vista de los cuales se deduce que cuatro efectos son estadísticamente significativos con un 95.0% de nivel de confianza, y que los factores más influyentes sobre la cantidad de MEK extraída en orden decreciente son el tiempo de extracción, la sal y la temperatura.

Tabla 5.6. ANOVA de MEK.

Factor	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: T	2.1657E16	1	2.1657E16	13.82	0.0013
B: t extr	7.40774E16	1	7.40774E16	47.26	0.0000
C: Sal	5.95168E16	1	5.95168E16	37.97	0.0000
AA	1.9022E16	1	1.9022E16	12.14	0.0022
AB	5.72871E15	1	5.72871E15	3.65	0.0696
AC	1.41744E14	1	1.41744E14	0.09	0.7666
BB	6.38454E14	1	6.38454E14	0.41	0.5302
BC	7.34846E13	1	7.34846E13	0.05	0.8307
CC	3.31592E14	1	3.31592E14	0.21	0.6503
bloques	7.38977E13	1	7.38977E13	0.05	0.8302
Error total	3.29159E16	21	1.56742E15		
Total (corr.)	2.31194E17	31			

R² = 85.7626%

Error estándar de la estimación = 3.95907E7

Error absoluto medio = 2.53097E7

F-ratio: Media de cuadrado factor/Media cuadrado error

El ANOVA realizado sobre la cantidad extraída de MIBK, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.7, indica que el número de efectos estadísticamente significativos es cinco y que el efecto principal es el tiempo de extracción, en mayor medida que para las otras dos cetonas, seguido de la temperatura y la sal.

A partir del modelo matemático de superficie de respuesta se obtuvieron una serie de ecuaciones ajustadas que expresan el área de los picos para las distintas cetonas en función de las distintas variables que le afectan:

$$\text{Área pico acetona} = -1.40 \cdot 10^8 + 9.54 \cdot 10^6 A + 1.66 \cdot 10^7 B + 1.23 \cdot 10^7 C - 61980 A^2 - 251380 AB$$

$$\text{Área pico MEK} = -2.29 \cdot 10^8 + 8.67 \cdot 10^6 A + 1.68 \cdot 10^7 B + 1.75 \cdot 10^8 C - 66737 A^2$$

$$\text{Área pico MIBK} = -3.88 \cdot 10^8 + 2.79 \cdot 10^7 A + 4.72 \cdot 10^7 B + 3.92 \cdot 10^8 C - 193321 A^2 - 262886 AB$$

Tabla 5.7. ANOVA para MIBK.

Factor	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: T	2.88141E17	1	2.88141E17	32.05	0.0000
B: t extr	1.18502E18	1	1.18502E18	131.80	0.0000
C: Sal	3.39123E17	1	3.39123E17	37.72	0.0000
AA	1.59617E17	1	1.59617E17	17.75	0.0004
AB	5.59784E16	1	5.59784E16	6.23	0.0210
AC	1.03417E16	1	1.03417E16	1.15	0.2957
BB	3.11864E15	1	3.11864E15	0.35	0.5622
BC	3.38734E16	1	3.38734E16	3.77	0.0658
CC	2.17741E15	1	2.17741E15	0.24	0.6277
bloques	1.68318E15	1	1.68318E15	0.19	0.6697
Error total	1.88818E17	21	8.99132E15		
Total (corr.)	2.39538E18	31			

R² = 92.1174%

Error estándar de la estimación = 9.48226E7

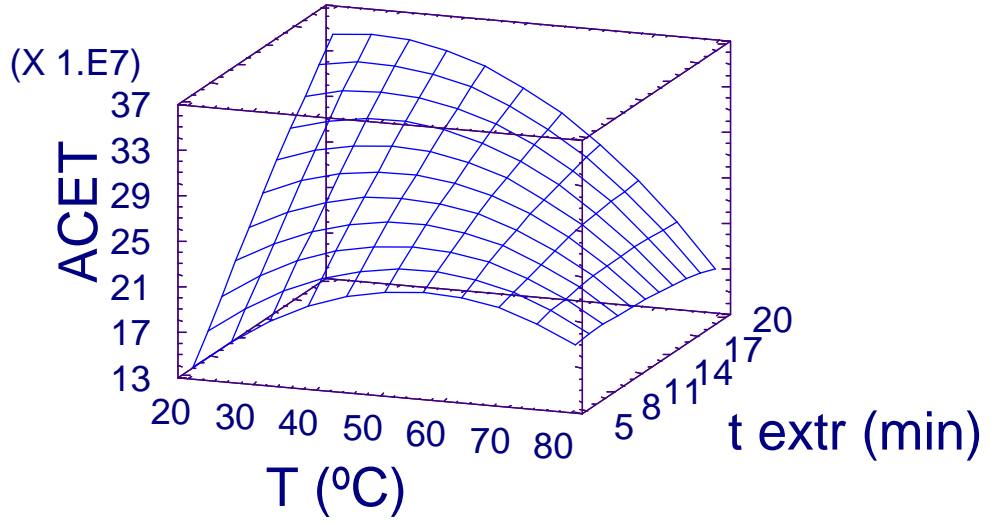
Error absoluto medio = 5.69062E7

F-ratio: Media de cuadrado factor/Media cuadrado error

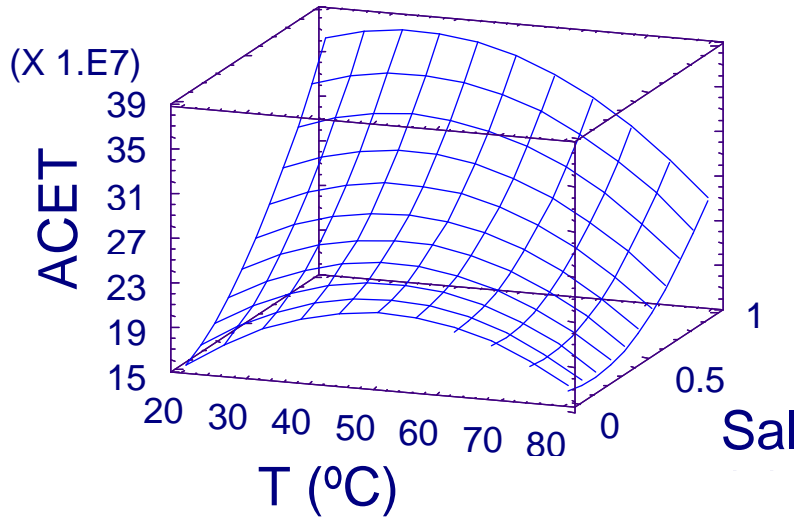
La manera en que los factores influyen en la eficiencia de la extracción se ha ilustrado mediante superficie de respuesta en tres dimensiones donde la variación de dos factores experimentales se representa mientras la tercera se mantiene constante con su valor central.

Las Figuras 5.3, 5.4 y 5.5 muestran las superficies de respuesta de la extracción de acetona, MEK y MIBK, respectivamente, en función de los factores estudiados.

(a) Sal=0.6 g



(b) t extr=12.5



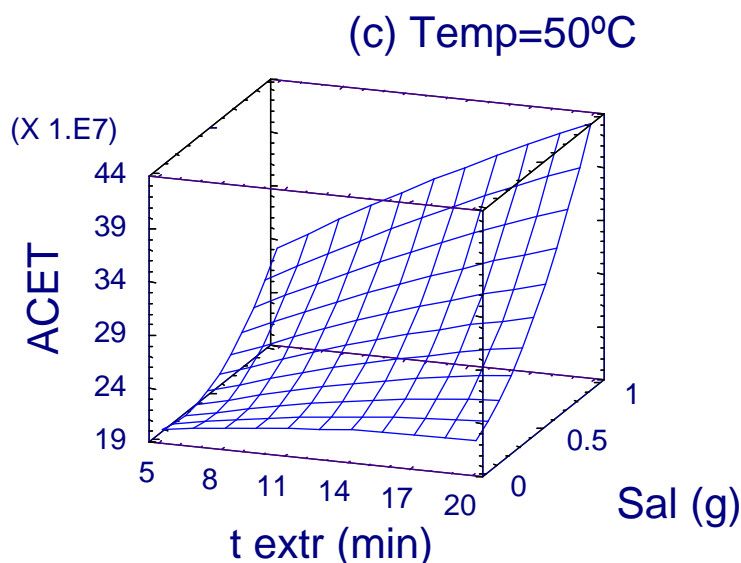
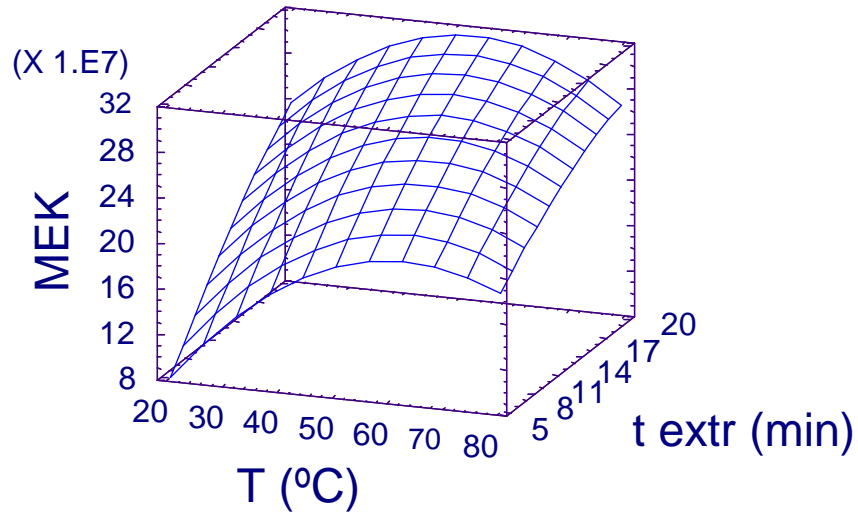


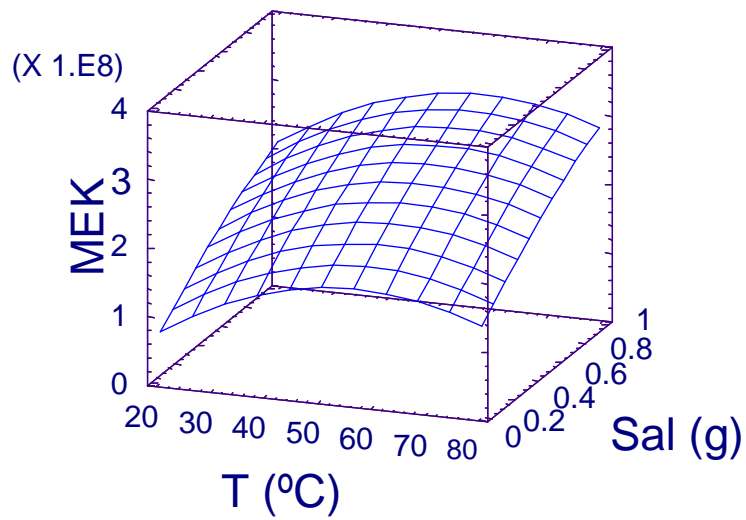
Figura 5.3. Superficies de respuesta para la extracción de acetona en función de los factores estudiados con una concentración de 10 mg/l.

A la vista de las gráficas obtenidas se deduce que tanto MEK como MIBK se comportan de manera similar. En la Figura 5.4a se muestra la respuesta de MEK en función del tiempo de extracción y la temperatura, con 0.6 g de sal añadida, donde la altura de la superficie representa el valor del área del pico de MEK. Como puede observarse, el área aumenta con la temperatura y con el tiempo de extracción hasta aproximadamente los 50°C, a partir de la cual, empieza a disminuir. Algo muy parecido a lo que ocurre con la temperatura y la sal cuando el tiempo de extracción se mantiene constante (Figura 5.4b). Las gráficas indican que tanto el tiempo de extracción como la sal influyen positivamente sobre la respuesta de las tres cetonas estudiadas. Sin embargo, la acetona se comporta de manera diferente ya que tiene una temperatura óptima más baja (Figura 5.3a y 5.3b).

(a) Sal=0.6 g



(b) $t_{\text{extr}} = 12.5$ min



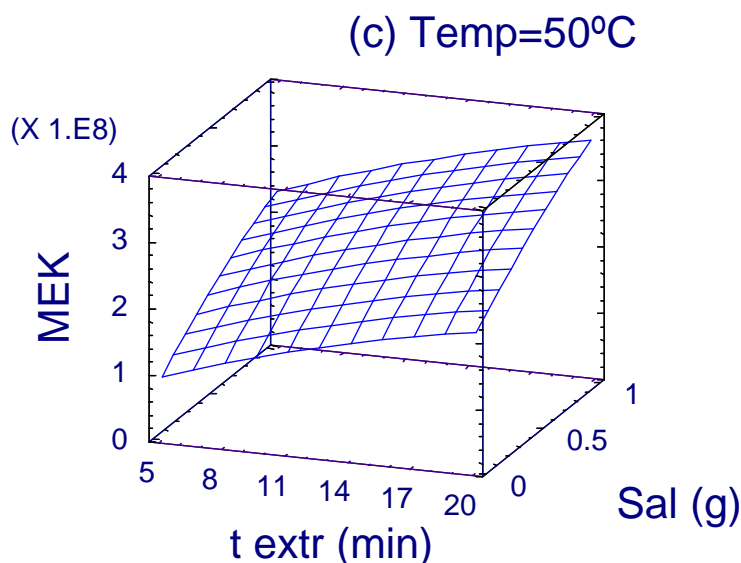
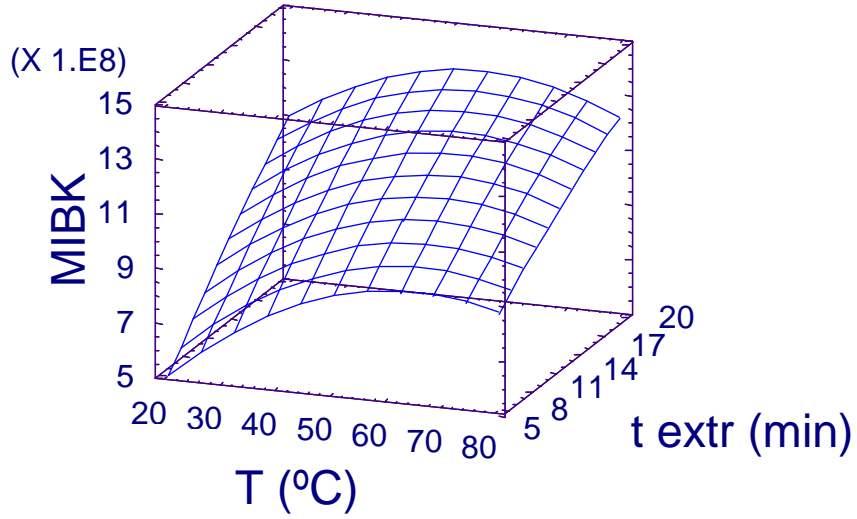


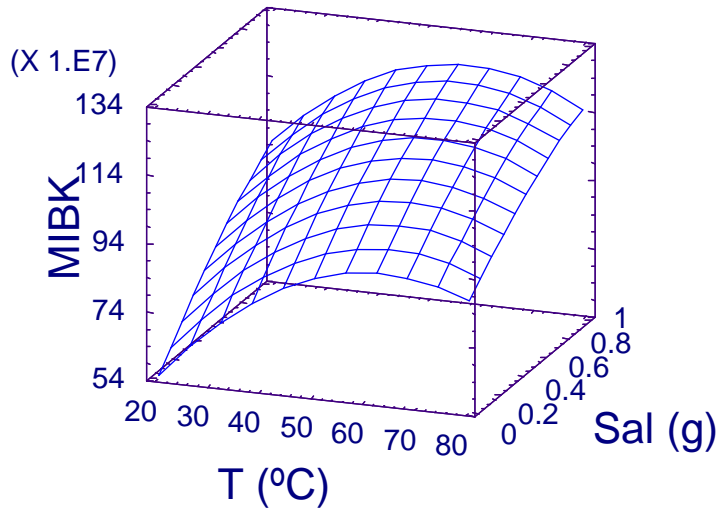
Figura 5.4. Superficies de respuesta para la extracción de MEK en función de los factores estudiados con una concentración de 1 mg/l.

A partir de las ecuaciones de regresión anteriormente descritas, se han podido obtener las condiciones óptimas de extracción para cada una de las cetonas. La máxima respuesta se consigue con una temperatura de 20°C para acetona y aproximadamente de 50°C para MEK y MIBK, con un tiempo de extracción de 20 minutos, y con la adición de 1 g de sal, condiciones semejantes a las descritas para la determinación de MEK en orina [38]. A pesar de que la temperatura de extracción óptima para acetona es de 20°C, para la extracción simultánea de las tres cetonas se ha elegido de 50°C, ya que la temperatura de extracción para acetona no es tan crítica como para las otras dos cetonas, debido al hecho de que la acetona se encuentra en una mayor concentración que MEK y MIBK, con un VLB también mayor, 50 mg/l para acetona frente a 2 y 3.5 mg/l para MEK y MIBK, respectivamente.

(a) Sal=0.6 g



(b) t extr=12.5 min



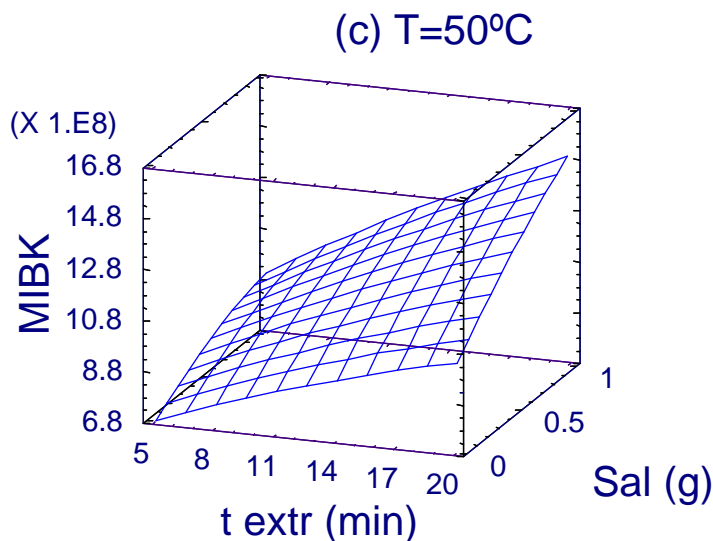


Figura 5.5. Superficies de respuesta para la extracción de MIBK en función de los factores estudiados con una concentración de 1 mg/l.

5.3.3 Validación del método SPME

Una vez que se han establecido las condiciones óptimas de extracción, 50°C, 20 min, 1 g de sal, se ha llevado a cabo la validación del método. Con el objeto de estudiar el rango de aplicabilidad del método se prepararon muestras de orina de personas no expuestas a las que se les añadió las cetonas estudiadas y THF, y se analizaron con las condiciones óptimas del método desarrollado de SPME. En la Figura 5.6 se muestra un cromatograma obtenido del análisis de una muestra de orina con una concentración de 1.47 µg/ml de acetona, 0.28 µg/ml de MEK, 0.07 µg/ml de THF y 0.13 µg/ml de MIBK.

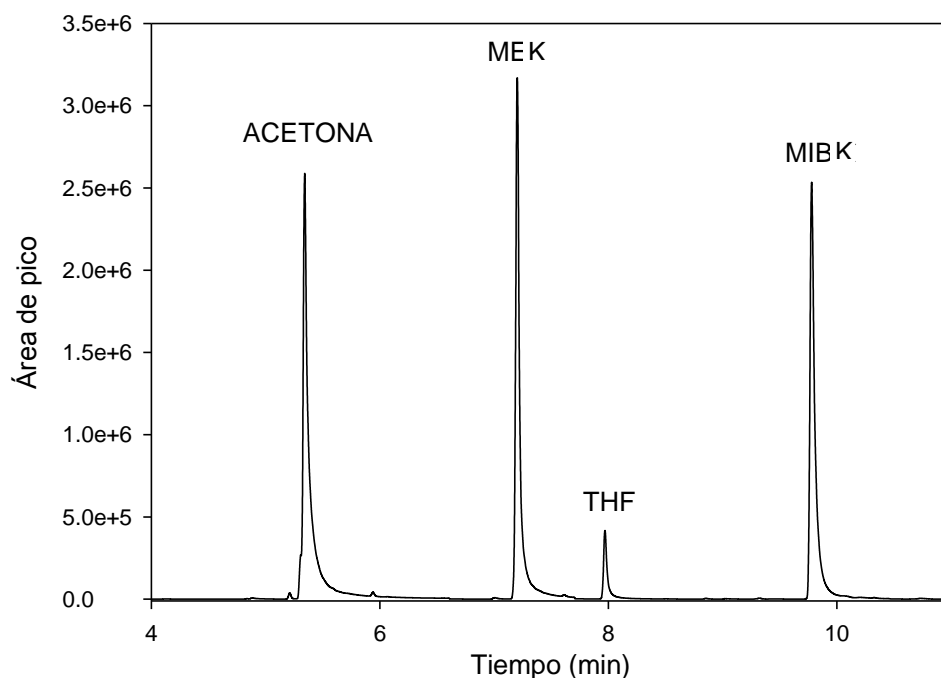
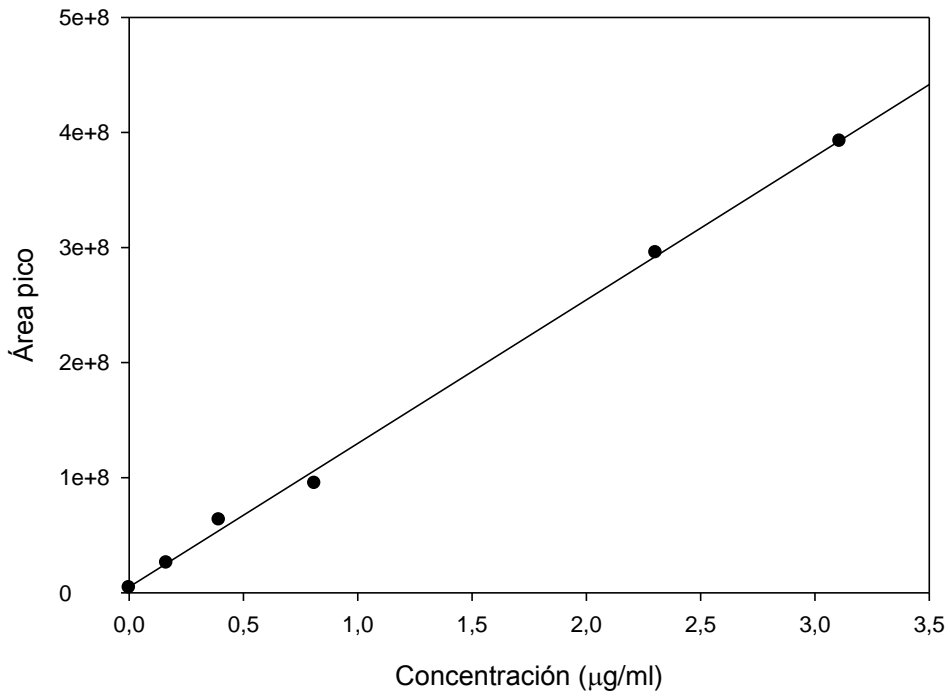


Figura 5.6. Cromatograma de una muestra de orina de 1.47 $\mu\text{g/ml}$ de acetona, 0.28 $\mu\text{g/ml}$ de MEK, 0.07 $\mu\text{g/ml}$ de THF y 0.13 $\mu\text{g/ml}$ de MIBK. Modo SIM.

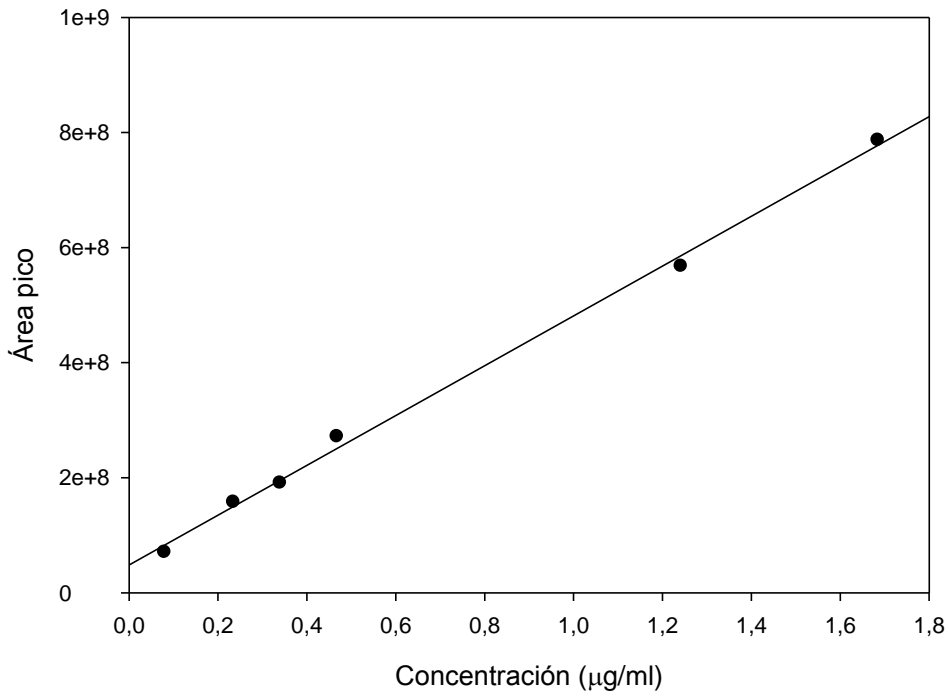
Para evaluar la linealidad del método se han realizado estudios de calibración para acetona, MEK, MIBK y THF, conjuntamente. En la Figura 5.7 se representan las rectas de calibrado obtenidas.

Los parámetros obtenidos a partir de las ecuaciones de las rectas se muestran en la Tabla 5.8. Los coeficientes de correlación ($R > 0.995$) indican buena linealidad en el rango estudiado, indicando una correlación alta entre el área de los picos del compuesto y la concentración de la muestra.

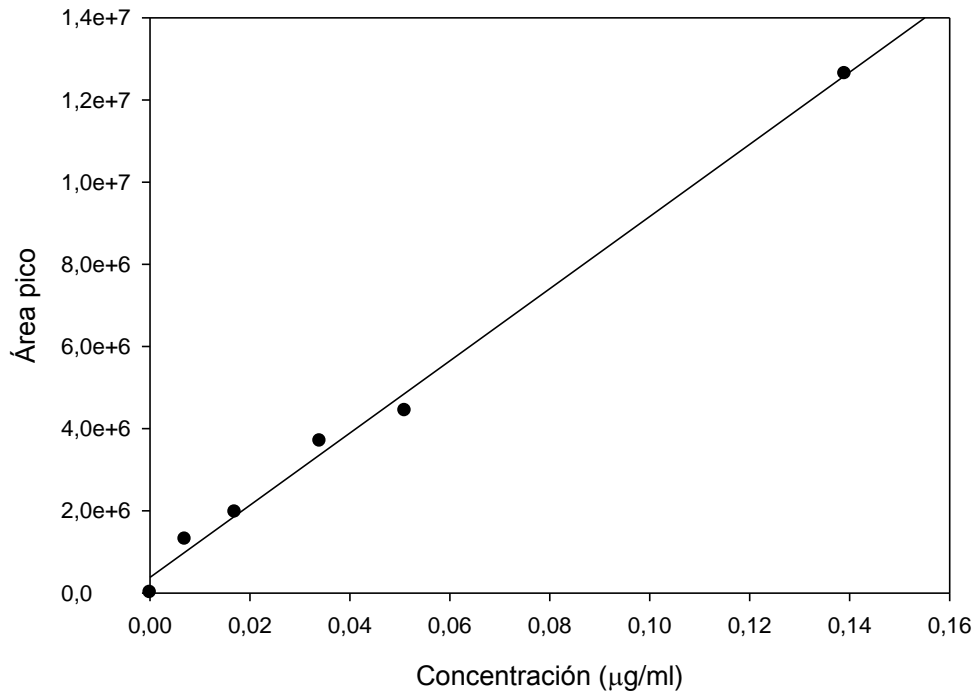
(a)



(b)



(c)



(d)

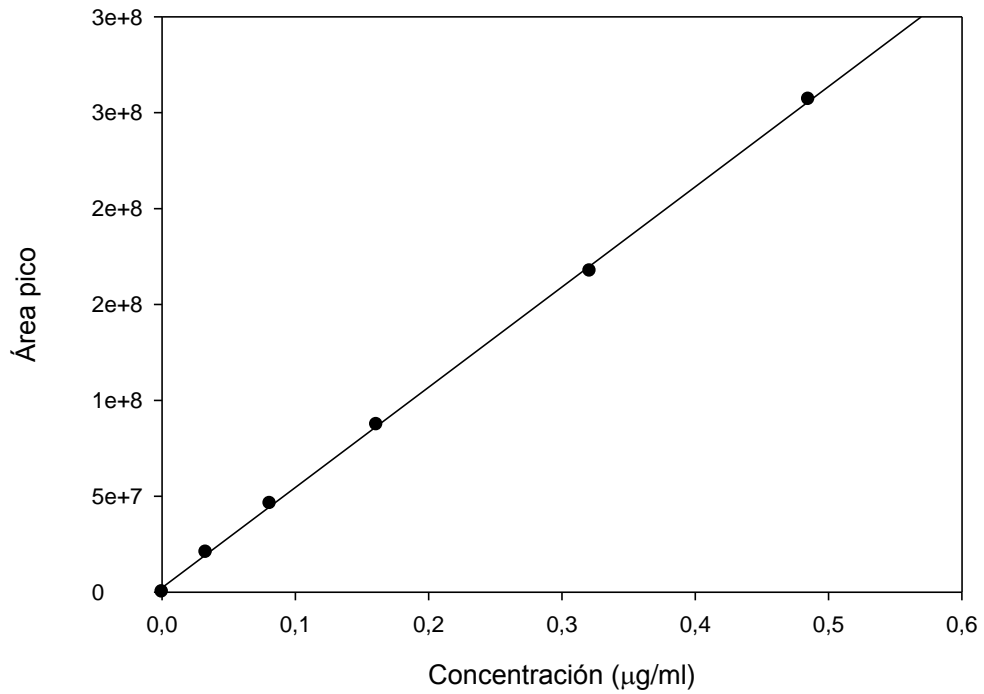


Figura 5.7. Curvas de calibrado de (a) acetona, (b) MEK, (c) THF y (d) MIBK

Tabla 5.8. Rectas de regresión, coeficientes de correlación entre el área de pico y la concentración en la muestra, y límites de detección.

	Recta: $y = a + bx$	r	LD ($\mu\text{g/ml}$)
Acetona	$y = 5.06 \cdot 10^6 + 1.25 \cdot 10^8 x$	0.9991	0.18
MEK	$y = 4.85 \cdot 10^7 + 4.33 \cdot 10^8 x$	0.9986	0.11
MIBK	$y = 2.29 \cdot 10^6 + 5.23 \cdot 10^8 x$	0.9998	0.01
THF	$y = 3.81 \cdot 10^5 + 8.79 \cdot 10^7 x$	0.9974	0.01

x concentración ($\mu\text{g/ml}$)
y área del pico
r coeficiente de correlación
LD límite de detección

Los valores de los límites de detección (LD) mostrados en la Tabla 4.8, no son tan bajos como otros obtenidos en otros estudios para la determinación de MEK en orina [24,38], pero sí son lo suficientemente bajos para su aplicación en el control biológico de la exposición laboral. De este modo, para acetona, MIBK y THF los LD fueron de aproximadamente dos órdenes de magnitud menores que sus límites de exposición ocupacional (50 mg/l para acetona, 1 mg/l para MIBK y 2 mg/l para THF) [10,11], mientras que el LD de MEK fue aproximadamente un orden de magnitud menor que su límite de exposición (2 mg/l) [10,11], siendo el LD de MEK lo suficientemente pequeño como para ser capaz de detectar los valores encontrados en la orina de trabajadores expuestos [43].

La precisión del método, en términos de repetibilidad, expresada como la desviación estándar relativa (RSD), se ha evaluado utilizando alícuotas de orina tomadas de una muestra a la que previamente se le adicionó una cantidad conocida de acetona, MEK y MIBK, en 6 réplicas, a dos niveles de concentración dentro del rango de linealidad (1.17 y 3.95 $\mu\text{g/ml}$ de acetona; 0.24 y 0.80 $\mu\text{g/ml}$ de MEK; y 0.23 y 0.80 $\mu\text{g/ml}$ de MIBK). Los resultados se muestran en la Tabla 5.9.

Los datos obtenidos de repetibilidad, calculados a partir de los resultados para MIBK obtenidos en ensayos realizados en días distintos, expresada como RSD, se muestran en la Tabla 5.10.

Tabla 5.9. Precisión intradía o repetibilidad (% RSD), n=6.

Nivel de Concentración	RSD (%)		
	ACETONA	MEK	MIBK
1	10.6	9.3	9.3
2	9.1	2.6	4.3

Tabla 5.10. Datos de repetibilidad interdía para la extracción de MIBK en orina, n=6.

<i>MIBK en orina (2 mg/l)</i>	<i>Área</i>
Tª: 50°C	1109167861
T. extr.: 12.5 min	1112969382
NaCl: 0.6	1187517079
	1248753546
	1262283330
	1306509055
	1111564118
	1104829695
Media	1180449258
Desviación estándar	82289879
RSD (%)	7.0

Tal y como queda reflejado en la Tabla 5.9 y 5.10, los valores obtenidos para RSD, trabajando con las condiciones óptimas, están comprendidos entre un 3 y un 11%, coincidiendo con los valores obtenidos en otros estudios para MEK en orina [38], y para otros compuestos volátiles en orina [24,25,28,44] y en sangre [36], utilizando la misma técnica de análisis.

5.3.4 Estudio comparativo

El comportamiento del método mediante SPME se evaluó por comparación con el método automático de HS-GC-MS anteriormente descrito (ver Apartado 5.2.3). Las muestras de orina de concentración conocida, denominadas 12 A y 12 B, procedentes de un control de calidad externo se analizaron por los dos métodos. En el caso del análisis mediante SPME se utilizó un factor de dilución de 50.

En la Tabla 5.14 se muestran los resultados obtenidos mediante ambos métodos.

Tabla 5.14. Concentración ($\mu\text{g/ml}$) de acetona, MEK, THF y MIBK para dos muestras enviadas por G-EQUAS y analizadas por el método desarrollado con SPME y el método HS.

	G-EQUAS	ACETONA	MEK	THF	MIBK
HS	12 A	16.57	2.42	0.84	2.11
	12 B	79.10	14.95	3.38	7.26
SPME	12 A	16.51	3.40	1.00	2.54
	12 B	75.03	15.68	4.03	6.68

La comparación de los métodos se realizó mediante la prueba t de Student para muestras apareadas, que adopta como hipótesis nula que la media de las diferencias entre las concentraciones dadas por dos métodos distintos es cero. En la Tabla 5.15 se muestran los resultados de la prueba, que indican que para los cuatro compuestos no existen diferencias significativas entre las concentraciones encontradas por cada uno de los métodos analíticos.

En la Tabla 5.15 se muestran los resultados satisfactorios obtenidos con el método basado en SPME en el programa de calidad interlaboratorios para el análisis toxicológico de materiales biológicos G-EQUAS.

Tabla 5.15. Comparación del método SPME con el método basado en la técnica de HS mediante el análisis de comparación de muestras por parejas.

	ACETONA	MEK	MIBK	THF
N	7	6	5	6
X	1.09	0.55	0.48	0.4
SD	4.88	0.68	1.28	0.53
EE _{Media}	1.84	0.28	0.57	0.22
t	0.59	1.99	0.84	1.87
P	0.577	0.103	0.448	0.121
t crítico	2.45	2.57	2.78	2.57
IC 95%	(-3.42, 5.60)	(-1.26, 0.16)	(-1.11, 2.07)	(-0.95, 0.15)

N: número de muestras

X: valor medio de las diferencias en valor absoluto

SD: desviación estándar

t: valor de t obtenido

P: valor de probabilidad obtenido

IC: límites de confianza al 95%

EE _{Media}: error estándar de la media

t crítico: valor de t crítico para un límite de confianza del 95%

Tabla 5.15. Resultados obtenidos en la participación en el programa de intercomparación para el análisis toxicológicos en materiales biológicos (G-EQUAS).

Parámetro	Evaluación	Resultado laboratorio	Valor de ref.	Rango de tolerancia	Unidad
Acetona en orina	A: +	34.1	32.9	26.6 - 39.2	mg/l
	B: +	109.1	94.8	79.8 - 109.9	
MEK en orina	A: +	8.2	7.8	6.2 - 9.5	mg/l
	B: +	17.3	15.0	12.3 - 17.7	
MIBK en orina	A: +	4.0	5.1	3.6 - 6.5	mg/l
	B: +	5.7	7.1	5.3 - 8.9	
THF en orina	A: +	0.7	1.0	0.7 - 1.3	mg/l
	B: +	7.8	6.7	5.2 - 8.3	

5.4 Conclusiones

El diseño experimental ha resultado de utilidad para la optimización de las condiciones del método estudiado de SPME teniendo en cuenta las interacciones entre los factores que afectan al proceso de extracción, con un número de ensayos mínimo, lo que conlleva un considerable ahorro de tiempo. La principal ventaja del método desarrollado es que se trata de un método accesible para los laboratorios no especializados, ofreciendo la posibilidad de realizar análisis de rutina para el control biológico de la exposición a laboratorios provistos de GC sin la necesidad de nuevos y complejos equipos. La buena linealidad, precisión y los bajos límites de detección obtenidos indican que el método SPME es un método adecuado que proporciona resultados suficientemente sensibles y exactos para el control biológico simultáneo de estas tres cetonas -acetona, MEK y MIBK- y de THF, todos ellos sin metabolizar en orina, lo que resulta de gran utilidad para la evaluación de la exposición laboral a estos contaminantes.

5.5 Bibliografía

- [1] M. Jakubowski, M. Trzcinka-Ochocka, J. Occup. Health 47 (2005) 22.
- [2] S. Fustinoni, M. Buratti, R. Giampiccolo, G. Brambilla, V. Foá, A. Colombi, Int. Arch. Occup. Environ. Health 73 (2000) 189.
- [3] T. Kawai, Z-W. Zhang, A. Tackeuchi, Y. Miyama, K. Sakamoto, K. Higashikawa, M. Ikeda, Int. Arch. Occup. Environ. Health 76 (2003) 17.
- [4] M. Imbriani, S. Guittori, Int. Arch. Occup. Environ. Health 78 (2005) 1.
- [5] Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 7th Ed. ACGIH, Cincinnati, OHIO, 2001.
- [6] Merck Index, 14th ed., Merck & Co. Inc., 2006.
- [7] Encyclopaedia of Toxicology, second ed., Elsevier. Inc., 2005.
- [8] WHO (World Health Organization). International Programme on Chemical Safety (IPCS). INCHEM. EHCs (Environmental Health Criteria).
- [9] U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Toxicological review. 2003.

- [10] American Conference of Government Industrial Hygienist 2012. Threshold Limit Values (TLVs) and Biological Exposure Index (BEIs) for chemical substances and physical agents. ACGIH, Cincinnati, OHIO, 2012.
- [11] I.N.S.H.T. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España 2013. Ed. INSHT, Madrid, 2013.
- [12] U.S. Environmental Protection Agency (EPA). EPA Waste's official compendium of analytical and sampling methods. Disponible en <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/>.
- [13] B. Kolb, L.S. Ettre, Static Headspace Gas Chromatography, Theory and Practice, 2nd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [14] M. Ikeda, Int. Arch. Occup. Environ. Health 81 (2008) 935.
- [15] V.I. Safarova, S.V. Sapelnikova, E.V. Djazhenko, G.I. Teplova, G.F. Shajdulina, F.Kh. Kudasheva, J. Chromatogr. B 800 (2004) 325.
- [16] I. Missaoui, L. Sayedi, B. Jamoussi, B.B. Hassine, J. Chromatogr. Science 47 (2009) 257.
- [17] N. Sugaya, T. Nakagawa, K. Sakurai, M. Morita, S. Onodera, J. Health Science 47 (2001) 21.
- [18] I.A. Wasfi, A.H. Al-Awadhi, Z.N. Al-Hatali, F.J. Al-Rayami, N.A. Al-Katheeri, J. Chromatogr. B 799 (2004) 331.
- [19] M.J. Cardador, M. Gallego, J. Chromatogr. B 878 (2008) 26.
- [20] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, J. Chromatogr. B 848 (2010) 1824.
- [21] M.J. Scotter, D.P.T. Roberts, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 386.
- [22] H. Lord, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 902 (2000) 17.
- [23] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145.
- [24] G.A. Mills, V. Walker, J. Chromatogr. A 902 (2000) 267.
- [25] C. Prado, J. Garrido, J.F. Periago, J. Chromatogr. B 804 (2004) 255.
- [26] K-J. Chia, S-D. Huang, Anal. Chim. Acta 539 (2005) 49.
- [27] S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, V. Foà, J. Chromatogr. B 817 (2005) 309.
- [28] D. Poli, P. Manini, R. Andreoli, I. Franchini, A. Mutti, J. Chromatogr. B 820 (2005) 95.
- [29] L. Scibetta, L. Campo, R. Mercadante, V. Foà, S. Fustinoni, Anal. Chim. Acta 581 (2007) 53.
- [30] Y. Liu, S. Muralidhara, J.V. Bruckner, M.G. Bartlett, J. Chromatogr. B 863 (2008) 26.
- [31] V. Walker, G.A. Mills, E.M. Stansbridge, J. Chromatogr. B 877 (2009) 784.

- [32] N. Rastkari, R. Ahmadkhaniha, M. Yunesian, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1568.
- [33] P.C.F. de Lima Gomes, E.D. D'Andrea, C.B. Mendes, M.E.P.B. de Siqueira, J. Braz. Chem. Soc. 21 (2010) 119.
- [34] D.M. Chambers, D.O. McElprang, M.G. Waterhouse, B.C. Blount, Anal. Chem. 78 (2006) 5375.
- [35] C. Deng, W. Zhang, J. Zhang, X. Zhang, J. Chromatogr. B 805 (2004) 235.
- [36] D. Zuba, A. Parczewski, M. Reichenbacher, J. Chromatogr. B 773 (2002) 75.
- [37] V-S. Wang, M-Y Lu, J. Chromatogr. B 877 (2009) 24.
- [38] J-S. Chou, T-S. Shih, C-M. Chen, JOEM 41 (1999) 1042.
- [39] J.C. Miller, J.N. Miller (Eds.), Estadística para Química Analítica. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware, USA, 1993.
- [40] R.G. Brereton, Applied Chemometrics for scientists, John Wiley & Sons, England, 2007.
- [41] T. Górecki, P. Martos, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 70 (1998) 19.
- [42] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, Ed. Reverté, s.a., Barcelona, 1989.
- [43] M. Yoshikawa, T. Kawamoto, K. Murata, K. Arashidani, T. Katoh, Y. Kodoma, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29 (1995) 135.
- [44] S. Fustinoni, R. Giampiccolo, S. Pulvirenti, M. Buratti, A. Colombi, J. Chromatogr. B 723 (1999) 105.

Capítulo 6

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA – CROMATOGRFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL MUESTREO Y DETERMINACIÓN DE ESTIRENO SIN METABOLIZAR EN ORINA

6 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA – CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL MUESTREO Y DETERMINACIÓN DE ESTIRENO SIN METABOLIZAR EN ORINA

6.1 Introducción

Los indicadores biológicos que pueden utilizarse actualmente para el control biológico de la exposición a estireno son la suma ácido mandélico y ácido fenilglicólico en orina y estireno en sangre venosa [1,2].

Se ha propuesto también el estireno en orina como biomarcador cuantitativo de la exposición laboral, debido a las buenas correlaciones encontradas entre las concentraciones de estireno ambientales y las concentraciones de estireno en la orina de los trabajadores de la industria del plástico reforzado con fibra de vidrio [3-6]. Este sería un indicador biológico específico de la exposición a estireno ya que no se encuentra estireno endógeno en orina.

Para la determinación de compuestos volátiles en la orina una de las primeras técnicas utilizadas fue la extracción con disolventes [7,8], sin embargo planteaba numerosos problemas, de los cuales el más importante era que la evaporación del disolvente iba acompañada de la pérdida de los compuestos de bajo punto de ebullición. Como alternativa, se han descrito métodos utilizando espacio de cabeza manuales [5,9,10] y automáticos [4,11,12] y también se han desarrollado métodos de purga y trampa, basados en la concentración de estireno en un adsorbente sólido y seguido del análisis por desorción térmica-cromatografía gaseosa [13]. Más recientemente, se han desarrollado métodos fiables y exactos utilizando microextracción en fase sólida para determinar concentraciones de compuestos orgánicos volátiles en orina [14-16]. Sin embargo, todos los métodos anteriormente mencionados implican la manipulación, transporte y almacenamiento de muestras líquidas de orina, con la condición de que las muestras de orina deben ser analizadas tan pronto como sea posible para evitar la pérdida de compuestos volátiles. Es necesario tener en cuenta que la fase pre-analítica, incluyendo la recogida de muestra, almacenamiento y transporte, juega un papel importante en la calidad de los resultados finales [17].

Generalmente la orina se recoge en envases de vidrio o plástico que se refrigeran y se envían al laboratorio, donde las muestras se transfieren a viales para el análisis. El transporte de muestras líquidas en recipientes desde el lugar de la toma de muestra a bajas temperaturas suele ser difícil. Además, hay muchos procesos que pueden afectar a la estabilidad de la muestra durante el almacenamiento y, especialmente, durante el transporte, como la precipitación de los componentes de la orina, la inestabilidad de los compuestos químicos orgánicos de interés y, en el caso de compuestos orgánicos volátiles, la pérdida del analito [18].

La extracción en fase sólida (SPE) (apartado 1.4.2.2) se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada para muestras líquidas, estando su utilización enfocada principalmente a la evaluación de contaminantes en agua [19-22] y, en menor medida, a la determinación de drogas en estudios toxicológicos [23-25]. Esta técnica está demostrando un gran potencial en el muestreo de campo de agua en áreas remotas [26].

Con el fin de eliminar las desventajas relacionadas con la manipulación de líquidos en el muestreo de orina, el Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) (Vandoeuvre, Francia) desarrolló un sistema de muestreo que combina la toma de muestra, el transporte y la conservación de fluidos biológicos, mejorando por tanto la estabilidad de los analitos. El sistema, que consiste en una jeringa especial unida a un cartucho por medio de un adaptador, se comercializó posteriormente con el nombre de Uriprel y se ha validado para creatinina y diferentes metabolitos de compuestos orgánicos tales como, benceno, estireno, disulfuro de carbono, tolueno, xileno, hidrocarburos aromáticos policíclicos y cadmio [27]. Como parte del estudio coordinado por el INRS, el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un método de muestreo y análisis para la determinación de estireno sin metabolizar en orina, utilizando el sistema de toma de muestra antes mencionado. En el estudio se ha estimado la influencia de diferentes variables que pueden afectar a la eficiencia de la extracción SPE -incluyendo el tipo de adsorbente, el eluyente, el volumen de elución, el flujo de elución y la utilización de una fracción de metanol en el disolvente de lavado-, y se ha evaluado el efecto simultáneo de las variables más significativas en la extracción de estireno utilizando la metodología del diseño experimental. Las condiciones experimentales seleccionadas se han aplicado después al estudio de los parámetros analíticos del método para la determinación de estireno en orina para el control biológico de la exposición laboral a estireno. Además, se ha comprobado la estabilidad del estireno en los cartuchos SPE durante tres periodos distintos de

almacenamiento y los resultados se han comparado con los de la estabilidad del estireno en la orina conservada de forma tradicional en viales.

6.2 Experimental

6.2.1 Reactivos y dispositivo de muestreo de orina

Los reactivos utilizados han sido los siguientes:

- estireno y sulfato sódico anhidro del 99.5% y 99% de pureza respectivamente, suministrados por Fluka
- metanol y el diclorometano (99,9 y 99.8% respectivamente), suministrados por Merck y
- acetato de etilo, 99.8 % de pureza que suministró Riedel-de Haën.

El agua de alta pureza se obtuvo a través de un sistema Milli-Q (Millipore). El patrón certificado de estireno en metanol (199.9 µg/ml) se obtuvo a través de Supelco, y se almacenó a -18°C.

El dispositivo Uriprel utilizado para el muestreo de orina, transporte y almacenamiento, representado en la Figura 6.1, consiste en una jeringa especial (S-Monovette[®], 4.5 ml, Sarstedt) con un adaptador (Multi-adaptador, Sarstedt) que proporciona una conexión entre la jeringa y el cartucho de extracción en fase sólida (SPE). Al otro lado del cartucho se acopla una punta de pipeta. Se han utilizado dos tipos de cartuchos SPE: cartuchos Sep-Pak[®] Plus C18 (500 mg de adsorbente), y cartuchos Oasis[®] HLB Plus (225 mg), suministrados ambos por Waters.

6.2.2 Preparación de los patrones de estireno

Se preparó una disolución patrón de estireno en metanol. Las disoluciones patrón de trabajo utilizadas para la calibración se prepararon a diario diluyendo diferentes cantidades de la disolución patrón en diclorometano o acetato de etilo y se analizaron por triplicado siempre junto con las muestras.

Las disoluciones de trabajo de estireno utilizadas para la extracción en fase sólida también se prepararon a partir de la disolución patrón de estireno diluyendo en orina procedente de personas no expuestas.

Para llevar a cabo medidas de exactitud y precisión se preparó una disolución de estireno a partir de un patrón comercial de estireno en metanol.

6.2.3 Procedimiento de muestreo de orina y extracción en fase sólida

Los cartuchos de SPE se acondicionaron antes de su utilización pasando a través de ellos 3 ml del eluyente, seguido de 3 ml de metanol y 3 ml de agua Milli-Q. Después los cartuchos se unieron a través de un adaptador a la jeringuilla de 4.5 ml y a una punta de pipeta por el otro extremo. En la Figura 6.1 se muestra un esquema del dispositivo de toma de muestra utilizado. La punta de pipeta se introduce en la orina y se hace pasar lentamente una alícuota a través del cartucho de SPE tirando del émbolo de la jeringa hasta que llega al punto más alto donde queda bloqueada. Una vez tomada la muestra, se desconectó el cartucho del sistema de muestreo y se lavó con 2 ml de agua Milli-Q que, en algunos casos, contenía un 5% (v/v) de metanol. El estireno retenido en el cartucho se desorbió con volúmenes comprendidos entre 1 y 4 ml de eluyente a un flujo de 0.2 a 4 ml/min, conseguido mediante una bomba de HPLC. Para eliminar cualquier resto de agua se utilizó sulfato sódico anhidro.

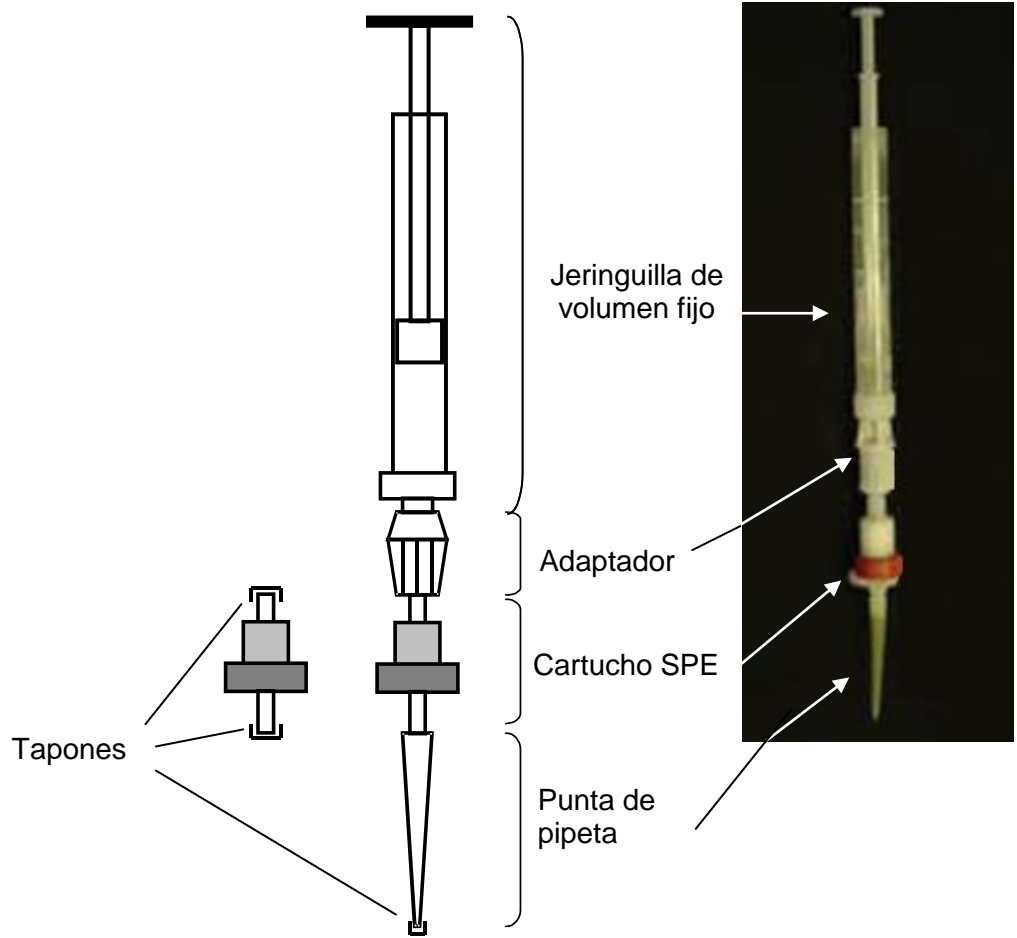


Figura 6.1. Esquema del dispositivo de muestreo utilizado, Uriprel.

6.2.4 Estudio de recuperación

La eficiencia del método SPE depende de muchos parámetros, como son el tipo de adsorbente o fase estacionaria del cartucho, el pH de la muestra, el tratamiento previo de la muestra, los disolventes utilizados para lavar y eluir el analito retenido en el cartucho, el volumen de elución, y la velocidad del flujo durante las distintas etapas [28].

En el caso estudiado, como el dispositivo de muestreo se ha diseñado para ser utilizado inmediatamente después de la recogida de orina, no es posible el pre-tratamiento de la muestra (modificación del pH o de la fuerza iónica, o adición de un componente orgánico), por lo que las variables estudiadas que pueden afectar a la eficiencia de la extracción han sido: el tipo de adsorbente del cartucho, el eluyente, el volumen de elución, el flujo de elución, y la adición de metanol al disolvente de lavado.

El primer paso en el desarrollo de un método que utiliza SPE es seleccionar el adsorbente más adecuado. Se han estudiado dos tipos de adsorbente, C18, que es el empaquetamiento más conocido y ampliamente utilizado como fase reversa para retener compuestos orgánicos de muestras acuosas y muestras biológicas, y Oasis HLB, un co-polímero formado por dos compuestos monómeros, divinilbenceno y *n*-vinilpirrolidina, con la misma utilidad que el adsorbente C18, pero que además puede ser ventajoso para aplicaciones de campo porque puede utilizarse sin acondicionamiento, y el hecho de no estar humedecido no altera el comportamiento del cartucho [29,30].

En cuanto al eluyente, se ha estudiado el diclorometano y el acetato de etilo, que pueden resultar adecuados cuando se va a utilizar la cromatografía gaseosa como técnica analítica [31,32].

Del mismo modo, se ha estudiado también si afecta, o no, la presencia del 5% de metanol en el disolvente de lavado, ya que se ha demostrado que el lavado del cartucho con agua/metanol consigue eliminar con éxito las interferencias de la matriz de orina en la determinación de drogas [23] y que una mezcla del 5% de metanol en agua resulta apropiada para eliminar las interferencias de la matriz sin afectar a las recuperaciones de contaminantes orgánicos de aguas residuales [33,34].

El estudio de todas las variables que afectan a la extracción de estireno, con objeto de conocer las condiciones óptimas con las que se obtiene una mayor recuperación podría resultar una tarea laboriosa. Para facilitar el estudio, el diseño

experimental reduce al máximo el número de ensayos necesarios para el estudio de las variables, y analizando estadísticamente las respuestas a los ensayos, se consigue la información necesaria para saber cómo afectan las variables y su interacción entre ellas a la recuperación de estireno.

La influencia de las variables de SPE sobre la extracción de estireno se ha estudiado con disoluciones de 170 µg/ml de estireno en orina, mediante el diseño experimental, desarrollado y evaluado utilizando el programa informático Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, 2000).

Se ha aplicado un diseño factorial fraccionado para cinco variables a dos niveles 2^{5-1} . En la Tabla 6.2 se muestra la lista de factores y los niveles bajo y alto que se han estudiado para el ensayo.

Tabla 6.2. Lista de factores y sus niveles para el diseño factorial.

Factores	bajo	alto
Adsorbente (A)	C18	OASIS
Eluyente (B)	AE	DCM
Volumen de elución (mL) (C)	1.0	4.0
Flujo de elución (mL/min) (D)	0.5	4.0
Fracción de metanol (%) (E)	0	5

AE: Acetato de etilo
DCM: Diclorometano

Se ha llevado a cabo una réplica del diseño en diferentes días y utilizando diferentes disoluciones, por lo que se han realizado un total de 32 ensayos.

Una vez conocidas las variables que afectan a la extracción, se ha creado un diseño experimental, donde se estudian los efectos de los factores con influencia significativa sobre la recuperación, con la finalidad de obtener una expresión que relacione la respuesta, es decir la cantidad extraída de estireno, como una función de los factores seleccionados, y también de las interacciones entre ellos.

6.2.5 Condiciones del análisis cromatográfico

Los análisis se han llevado a cabo utilizando un cromatógrafo de gases HP 6890 Plus (Hewlett-Packard) equipado con un muestreador automático HewlettPackard 7683 y un inyector split-splitless, que operó en modo splitless a 250°C. La columna utilizada ha sido una columna capilar de metil silicona entrecruzada de medidas 50 m x 0.2 mm I.D., con una fase estacionaria de 1 µm (HP-1 MS, J&W Scientific). La temperatura de la columna se mantuvo a 120 °C, y se ha utilizado helio como gas portador a un flujo constante de 1.2 ml/min. El volumen de inyección en la columna cromatográfica fue de 1 µl.

Se ha utilizado un espectrómetro de masas modelo HP 5973 con fuente de ionización por impacto de electrones (EI) que operó a 70 eV. La temperatura de la fuente de iones fue de 230°C, y se utilizó en el modo SIM (monitorización selectiva de iones) focalizando el ión molecular m/z 104. Diariamente se llevó a cabo la optimización de parámetros del espectrómetro de masas (Autotune) mediante autocalibración con perfluorotributilamina (PFTBA). El tiempo de retención del estireno fue de 6.5 minutos.

6.2.6 Estudio de la estabilidad del estireno en el cartucho SPE

El estudio se ha llevado a cabo utilizando una mezcla de orina procedente de personas sin exposición laboral, a la que se le añadió distintas cantidades de la disolución patrón de estireno en metanol obteniendo tres niveles de concentración: 5, 25 y 100 µg/ml de estireno.

Para cada nivel de concentración, se tomaron 3 series de 8 muestras utilizando el dispositivo de muestreo descrito en la Figura 6.1, con el cartucho Oasis HLB previamente acondicionado. Una vez tomada la muestra de orina, se pusieron los tapones para sellar los cartuchos y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente.

Cada serie de cartuchos se ha evaluado para tres tiempos distintos de almacenamiento a temperatura ambiente (1, 7 y 30 días). Antes del análisis, el cartucho se enjuagó con dos mililitros de agua Milli-Q. La etapa de elución se llevó a cabo con 1.5 mL de acetato de etilo a una velocidad de 0.5 mL/min.

Con objeto de comparar la estabilidad de estireno almacenado en los cartuchos SPE con la estabilidad de las muestras de orina tal como se almacenarían habitualmente, se almacenaron también viales conteniendo 10 ml de orina de cada uno de los tres niveles de concentración a -18°C . Los análisis de estas muestras de orina se realizaron en paralelo a los análisis de los cartuchos, es decir, una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento determinado se descongelaron 8 viales conteniendo la disolución de estireno en orina y se hizo pasar a través de un cartucho acondicionado. Posteriormente estos cartuchos se trataron de la misma forma que los almacenados eluyendo con acetato de etilo en vial que contenía sulfato sódico anhidro. En todos los casos se inyectó $1\ \mu\text{l}$ del extracto en la columna del cromatógrafo. Por lo tanto, se han analizado un total de 144 muestras, que se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Diseño del estudio de almacenamiento.

Nivel de concentración	Tiempo de almacenamiento (días)					
	Cartuchos SPE (t^{a} ambiente)			Viales (-18°C)		
	1	7	30	1	7	30
100 $\mu\text{g/ml}$	8	8	8	8	8	8
25 $\mu\text{g/ml}$	8	8	8	8	8	8
5 $\mu\text{g/ml}$	8	8	8	8	8	8

La estabilidad se ha evaluado como la razón R de los valores medios para ocho medidas para cada uno de los tres periodos de almacenamiento y para cada una de las tres concentraciones de estireno.

6.2.7 Estudio de campo

El funcionamiento del sistema de toma de muestras y análisis se ha comprobado también con varias muestras de orina obtenidas de trabajadores

expuestos al disolvente estudiado. Se han estudiado 13 personas que trabajan en la fabricación de poliéster reforzado con fibra de vidrio. Los especímenes de orina se han recogido inmediatamente después del final de la exposición, al término de la jornada laboral.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Estudio de recuperación

La matriz del diseño experimental realizado y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.3. Sobre los datos obtenidos del diseño se ha llevado a cabo un análisis de varianza (ANOVA), en el que se descompone la variabilidad de la variable respuesta, en este caso la recuperación, en las contribuciones debidas a cada uno de los efectos y a sus interacciones, lo que permite averiguar qué factores son estadísticamente significativos sobre la recuperación. Del ANOVA realizado, que se muestra en la Tabla 6.4, se han identificado, al tener valores de P menores de 0.05, siete factores como estadísticamente significativos sobre la recuperación, con un nivel de confianza del 95.0%.

En el gráfico de Pareto (Figura 6.2) cada factor se representa por una barra horizontal cuya longitud es proporcional al efecto estandarizado, que es del efecto estimado dividido por su error estándar. Mediante una línea vertical se define el límite de significación, considerándose significativos al 95% de confianza, los factores cuyo efecto estandarizado supere dicha línea. Los efectos están ordenados de mayor a menor importancia lo que permite identificar rápidamente los más importantes, que en este caso son el eluyente y el flujo de elución, y, en menor medida, el adsorbente utilizado. La utilización de acetato de etilo y del adsorbente Oasis HLB mejora la eficiencia de la extracción de estireno. La recuperación es mayor al nivel bajo del flujo de elución. La presencia de metanol en el disolvente de lavado no influye en la recuperación de la extracción.

Una vez conocidas las variables cuantitativas que afectan a la extracción, se ha creado un diseño experimental, donde se estudian los efectos de los dos factores con influencia significativa sobre la recuperación, a 3 niveles en 9 ensayos, con la finalidad de obtener una expresión que relacione la respuesta, es decir la cantidad extraída de

estireno, como una función de los factores seleccionados, y también de las interacciones entre ellos. El diseño experimental llevado a cabo, y los resultados del mismo, que se muestran en la Tabla 6.5, se ha realizado en un único bloque, sin réplicas, siendo el orden de los experimentos completamente aleatorio.

Tabla 6.3. Matriz de diseño y resultados (% de recuperación) del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} para la determinación de estireno.

Adsorbente	Eluyente	Volumen de elución	Velocidad de flujo de elución	Metanol	Recuperación %	
OASIS	DCM	1	0.5	5	54.3	58.2
C18	DCM	1	0.5	0	59.5	50.5
OASIS	DCM	1	4.0	0	33.3	45.6
OASIS	AE	4	0.5	5	90.0	97.8
C18	AE	4	0.5	0	93.2	83.3
C18	AE	1	0.5	5	82.8	83.6
OASIS	AE	4	4.0	0	74.8	77.7
OASIS	DCM	4	0.5	0	54.8	64.3
C18	AE	1	4.0	0	43.2	46.3
C18	DCM	4	4.0	0	40.9	43.8
OASIS	AE	1	0.5	0	89.8	83.3
C18	DCM	1	4.0	5	41.9	31.8
OASIS	AE	1	4	5	67.2	68.4
C18	DCM	4	0.5	5	44.7	57.4
C18	AE	4	4	5	63.2	52.3
OASIS	DCM	4	4	5	38.4	41.4

AE: Acetato de etilo
DCM: Diclorometano

Tabla 6.4. ANOVA.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: Adsorbente	457.531	1	457.531	14.46	0.0017
B: Eluyente	5941.59	1	5941.59	187.73	0.0000
C: Volumen elución	191.492	1	191.492	6.05	0.0265
D: Flujo elución	3553.25	1	3553.25	112.27	0.0000
E: Metanol	3.72645	1	3.72645	0.12	0.7363
AB	206.045	1	206.045	6.51	0.0221
AC	0.0002	1	0.0002	0.00	0.9980
AD	66.01	1	66.01	2.09	0.1693
AE	0.7442	1	0.7442	0.02	0.8802
BC	101.959	1	101.959	3.22	0.0929
BD	220.71	1	220.71	6.97	0.0185
BE	46.2722	1	46.2722	1.46	0.2453
CD	30.6544	1	30.6544	0.97	0.3407
CE	221.762	1	221.762	7.01	0.0183
DE	2.39805	1	2.39805	0.08	0.7869
bloques	5.78	1	5.78	0.18	0.6752
Error total	474.756	15	31.6504		
Total (corr.)	11524.7	31			

$R^2 = 95.8805 \%$

R^2 (ajustado para los grados de libertad) = 92.0185 %

Error estándar de la estimación = 5.62587

Media del error absoluto = 3.17625

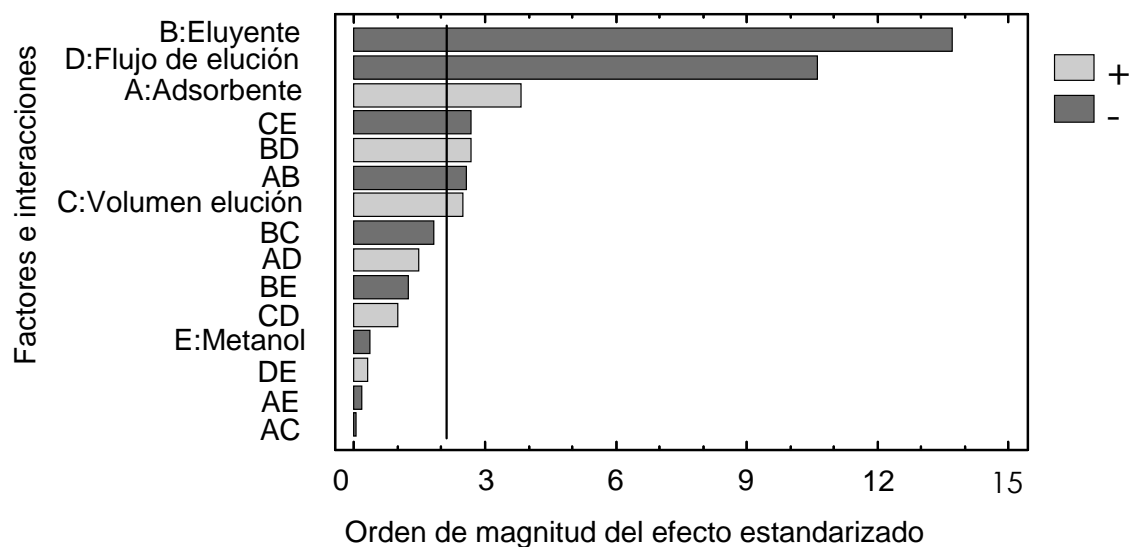


Figura 6.2. Gráfico de Pareto de los efectos obtenido del diseño factorial 2⁵⁻¹.

Tabla 6.5. Matriz de diseño experimental y las respuestas.

Volumen de elución (ml)	Flujo de elución (ml/min)	Recuperación (%)
4	1.1	89.11
1	0.2	87.86
1	2	68.42
4	0.2	78.58
2.5	1.1	83.21
2.5	2	83.12
4	2	86.47
2.5	0.2	86.82
1	1.1	80.88

Sobre los datos obtenidos del diseño se ha llevado a cabo un ANOVA. En este análisis se descompone la variabilidad de la variable respuesta, en este caso la cantidad de estireno recuperado, en las contribuciones debidas a cada uno de los efectos y a sus interacciones, lo que permite averiguar las variables que afectan de forma significativa a la cantidad de estireno recuperada. En la Tabla 6.6 se muestran los resultados de este análisis estadístico, del cual se deduce que hay solo un efecto, la interacción entre el volumen y el flujo de elución, estadísticamente significativo ($P < 0.05$) con un nivel de confianza del 95.0%.

En la Tabla 6.7 se muestran los datos de la ecuación, siendo la ecuación que se ajusta al modelo la siguiente:

$$\text{Recuperación} = 87.6646 + 1.86981 * \text{Volumen de elución} - 8.62788 * \text{Flujo de elución} - 1.10963 * \text{Volumen de elución}^2 + 5.06111 * \text{Volumen de elución} * \text{Flujo de elución} - 3.11317 * \text{Flujo de elución}^2$$

donde los valores de las variables se especifican en sus unidades originales.

Tabla 6.6. ANOVA.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
A: Volumen de elución	48.1667	1	48.1667	5.85	0.0943
B: Flujo de elución	38.7604	1	38.7604	4.71	0.1185
AA	12.4667	1	12.4667	1.51	0.3062
AB	186.732	1	186.732	22.68	0.0176
BB	12.7176	1	12.7176	1.54	0.3022
Error total	24.6959	3	8.23196		
Total (corr.)	323.539	8			

$R^2 = 92.367 \%$

R^2 (ajustado para los grados de libertad) = 79.6452 %

Error estándar de la estimación = 2.86914

Media del error absoluto = 1.32932

Tabla 6.7. Coeficientes de la ecuación.

Constante	= 87.6646
A: Volumen de elución	= 1.86981
B: Flujo de elución	= -8.62788
AA	= -1.10963
AB	= 5.06111
BB	= -3.11317

La manera en que los factores influyen en la eficiencia de la extracción se ha ilustrado mediante superficie de respuesta en tres dimensiones donde se representa la variación de los dos factores experimentales. En la Figura 6.3 se muestra la superficie de respuesta obtenida por el modelo en función del volumen y del flujo de elución.

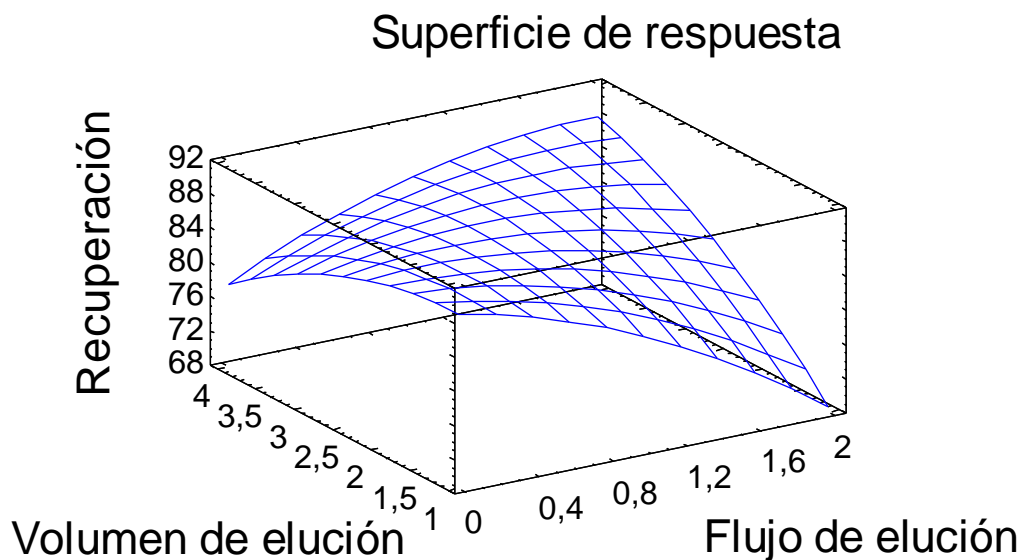


Figura 6.3. Superficie de respuesta para la recuperación de estireno en función del volumen y del flujo de elución.

En la gráfica de superficie de respuesta se observa una disminución en la recuperación tanto para un volumen de elución alto a un flujo de elución bajo como para un volumen de elución bajo con un flujo de elución alto. Utilizando volúmenes de elución bajos tiene lugar, además de la extracción, una concentración del contaminante, por lo que se prefiere utilizar en la práctica volúmenes de elución bajos con flujos también bajos. Con el objetivo de que el tiempo de análisis no sea excesivo, se ha llegado a la conclusión de que con volúmenes de elución de 1.5 ml obtenidos a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min se obtiene una recuperación satisfactoria, al mismo tiempo que tiene lugar una considerable concentración, con un tiempo aceptable de análisis de 3 minutos.

La Tabla 6.8 contiene información sobre los valores de recuperación generados utilizando el modelo ajustado, e incluye:

- (1) Los valores observados de recuperación (si los hay).
- (2) Los valores de recuperación obtenidos utilizando el modelo ajustado.
- (3) Límites de confianza (IC) al 95.0% para la respuesta de la media.

Tabla 6.8. Resultados estimados para la recuperación.

Fila	Valor Observado	Valor Ajustado	IC inferior al 95%	IC superior al 95%
1	89.11	86.4011	79.5953	93.2069
2	87.86	87.5869	79.3917	95.7822
3	68.42	68.8386	60.6434	77.0338
4	78.58	79.5886	71.3934	87.7838
5	83.21	86.0644	79.2587	92.8702
6	83.12	81.0011	74.1953	87.8069
7	86.47	88.1703	79.9751	96.3655
8	86.82	86.0844	79.2787	92.8902
9	80.88	80.7344	73.9287	87.5402
10		83.8233	77.8541	89.7925
11		79.4137	73.8238	85.0037
12		85.1513	79.4122	90.8904
13		81.7449	74.9576	88.5322
14		86.6763	81.2128	92.1398

Seleccionando el cartucho OASIS para la toma de muestras de orina y 1.5 ml de acetato de etilo a 0.5 ml/min para la elución del estireno retenido, el modelo predice una recuperación del 88.5% (80.8 - 96.6%, límites de confianza al 95%). Con el fin de verificar los resultados de los análisis, se ha llevado a cabo una experiencia de confirmación, cuyos resultados se muestran en la Tabla 6.9, obtenidos tras realizar seis extracciones repetidas de una disolución de estireno en orina de 174.7 µg/L, a la vista de los cuales, se deduce que los resultados obtenidos coinciden bastante bien con las predicciones y la recuperación obtenida es casi del 90%. Por lo tanto, se utilizaron las condiciones propuestas -cartuchos Oasis HLB, 1.5 mL de acetato de etilo a 0.5 mL/min como eluyente, para el resto de los estudios de validación del método de toma de muestra y análisis de estireno en orina mediante SPE.

Tabla 6.9. Recuperación de estireno de las muestras de orina.

	µg/L estireno extraído de la orina	Recuperación (%)
	151.1	86.5
	145.2	83.1
	154.7	88.5
	145.6	83.4
	173.9	99.5
	170.0	97.3
Media ± SD	156.8 ± 12.4	89.7 ± 6.4

6.3.2 Parámetros analíticos

La repetibilidad y la exactitud del método se determinaron analizando 6 réplicas de extracciones de patrones de estireno a dos niveles de concentración, 4.4 y 100 µg/L, preparados a partir del patrón comercial. Los resultados mostrados en la Tabla 6.10 indican que los valores de la desviación estándar relativa (RSD) son del 5.3% para el nivel de concentración más bajo y del 9.0% para el nivel más alto del patrón de orina. Estos valores coinciden con los obtenidos en otros estudios donde se determina

benceno [14,16], tolueno, etilbenceno y xilenos [14], y etanol [15], y son algo mayores que los encontrados utilizando un método de purga y trampa para la determinación de estireno en orina donde se obtuvo un valor de RSD de 4.1 y 5.4% para el nivel más bajo y más alto de concentración, respectivamente [13].

A partir del valor medio de la recuperación de estireno obtenida con SPE de las seis réplicas de análisis que se muestra en la Tabla 6.10, se ha determinado la exactitud del método. Como puede observarse, el valor medio presenta una buena concordancia con el valor de la concentración del patrón comercial. Los valores del sesgo relativo, expresado como

$$S = \frac{|\bar{X} - X_{ref}|}{X_{ref}} \times 100$$

donde \bar{X} es el valor medio obtenido aplicando el procedimiento de medida desarrollado y X_{ref} el valor aceptado como referencia o valor verdadero, han resultado de 4.7 y 2.3% para los niveles de concentración alto y bajo, respectivamente. Estos valores cumplen los requisitos para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en higiene industrial [35].

Los resultados de la incertidumbre global del procedimiento de medida se muestran también en la Tabla 6.10, donde ésta se expresa, de forma relativa, mediante una combinación del sesgo y de la precisión [36]. También en este caso los valores obtenidos son satisfactorios y similares a los que se encuentran mediante otros métodos empleados para determinar contaminantes sin metabolizar en fluidos biológicos [16,37].

Las curvas de calibración se obtuvieron para un rango de concentraciones comprendido entre 3.5 y 500 $\mu\text{g/L}$. Del análisis de regresión lineal llevado a cabo a partir de los datos de calibración, se ha obtenido un límite de detección instrumental de 6.6 $\mu\text{g/L}$ [38]. Este valor corresponde a un límite de detección de 2.2 $\mu\text{g/L}$ de estireno en orina para una muestra de 4 mL, un valor que es veinte veces menor que el índice de exposición biológico propuesto [4-6,10]. El límite de detección es mayor que el obtenido por otros métodos, sin embargo, la sensibilidad puede incrementarse aumentando el volumen de orina que se hace pasar por el cartucho. Con el dispositivo de toma de muestra aquí descrito, el volumen de orina que se pasa a través del cartucho corresponde al volumen de la jeringa unida al cartucho. Sin embargo, si se esperan concentraciones del analito bajas, puede ser muestreado un volumen mayor de orina, aumentando de este modo la sensibilidad. En la Figura 6.4 se muestra un

cromatograma representativo del extracto de SPE correspondiente a los niveles de concentración estudiados en la Tabla 6.10. También se incluye un cromatograma correspondiente al valor bajo de la concentración de estireno en orina muestreado utilizando dos jeringuillas de forma consecutiva es decir, tomando 8 ml de orina.

Tabla 6.10. Precisión y exactitud del método con muestras patrón de estireno.

	Concentración añadida de estireno a muestras de orina	
	100 µg/L	4.4 µg/L
	82.2	4.4
	105.3	4.5
	93.5	4.6
	98.4	4.4
	102.8	4.2
	89.8	4.5
Media	95.3	4.5
RSD (%)	9.03	5.31
Incertidumbre global*	21.90	12.19

$$(*) \frac{|\bar{x} - x_{real}| + 2s}{x_{real}} \cdot 100 \quad \text{donde: } \bar{x} \text{ es el valor de la media de las mediciones repetidas; } x_{real} \text{ es el valor verdadero de la concentración; } s \text{ es la desviación estándar de las mediciones}$$

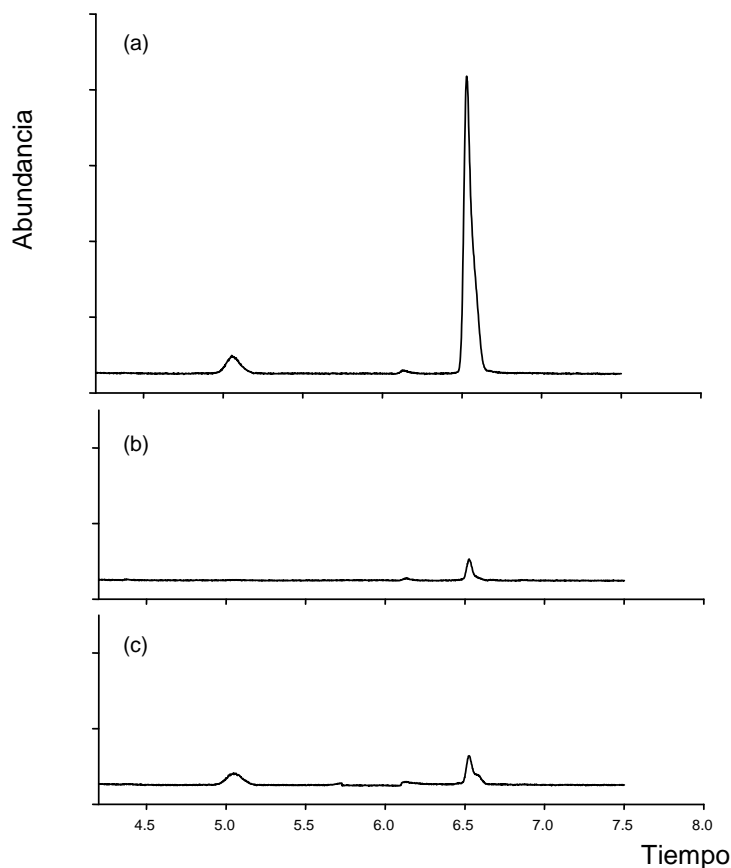


Figura 6.4: Cromatogramas con masas de m/z 104 obtenidos a partir de patrones de orina: (a) 4 ml de una disolución de 100 $\mu\text{g/L}$ de estireno, (b) 4 ml de una disolución de 4.4 $\mu\text{g/L}$ de estireno, y (c) 8 ml de una disolución de 4.4 $\mu\text{g/L}$ de estireno.

6.3.3 Estudio de estabilidad de estireno

Para estudiar la estabilidad del estireno retenido en los cartuchos almacenados, una vez realizada la extracción mediante el método optimizado, se llevaron a cabo una serie de experiencias, cuyos resultados se compararon con aquellos obtenidos con la extracción de la orina realizada después del almacenamiento de la muestra en viales. El estudio se llevó a cabo para tres niveles de concentración de estireno en orina, que se corresponden aproximadamente con 0.1, 0.5 y 2 veces el valor límite biológico propuesto para el estireno excretado en la orina [4-6,10]. Se analizaron ocho muestras para cada uno de los niveles de

concentración y para cada uno de los periodos de almacenamiento especificados en la sección 6.2.5. En la Figura 6.5 se muestran los resultados obtenidos para la recuperación media en cada caso.

La orina se almacenó en viales procurando dejar, por un lado, el mínimo espacio de cabeza posible para evitar pérdidas por evaporación del analito, y, por otro lado, el suficiente espacio de cabeza para evitar que se rompiera el vial de cristal al congelarse. Aún así, en algunos casos (marcados con un asterisco en la Figura 6.5) se produjo la rotura del vial de dos muestras de la serie durante su refrigeración. Este es uno de los problemas que pueden surgir del almacenamiento de la muestra en viales, que se traduce en un menor número de muestras útiles, contrariamente al almacenamiento en cartuchos, de los que no se rechazó ninguna muestra.

Las recuperaciones para el estireno almacenado en cartuchos están comprendidas entre el 83.7 y el 94.4%, mientras que las recuperaciones de estireno almacenado en viales se encuentran en el intervalo del 68.0 al 96.1%.

Con el fin de comparar los resultados para cada periodo de almacenamiento se ha llevado a cabo un ANOVA de los resultados de la recuperación para cada nivel de concentración. En este análisis se descompone la variabilidad de la respuesta, en este caso la recuperación de estireno, en dos: una variabilidad entre concentraciones, y otra entre las muestras dentro del grupo con la misma concentración.

En la Tabla 6.11a se muestran los resultados del ANOVA para el almacenamiento de cartuchos y en la Tabla 6.11b para la conservación en viales. De estos resultados se deduce que, ya que el valor P para las tres concentraciones es mayor que 0.05, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las recuperaciones de estireno de los cartuchos OASIS HLB para los tres periodos de almacenamiento en el rango de las concentraciones de estireno estudiadas con un 95% de nivel de confianza. Por el contrario, para las recuperaciones de estireno obtenidas de la extracción de los viales almacenados, en los niveles de concentración de 107.9 y 23.7 $\mu\text{g/L}$, sí existen diferencias estadísticamente significativas. Las recuperaciones obtenidas después de 30 días de almacenamiento, son menores en el caso de viales, y varían entre un 14 y un 20%, con respecto a los valores de recuperación obtenidos al día siguiente.

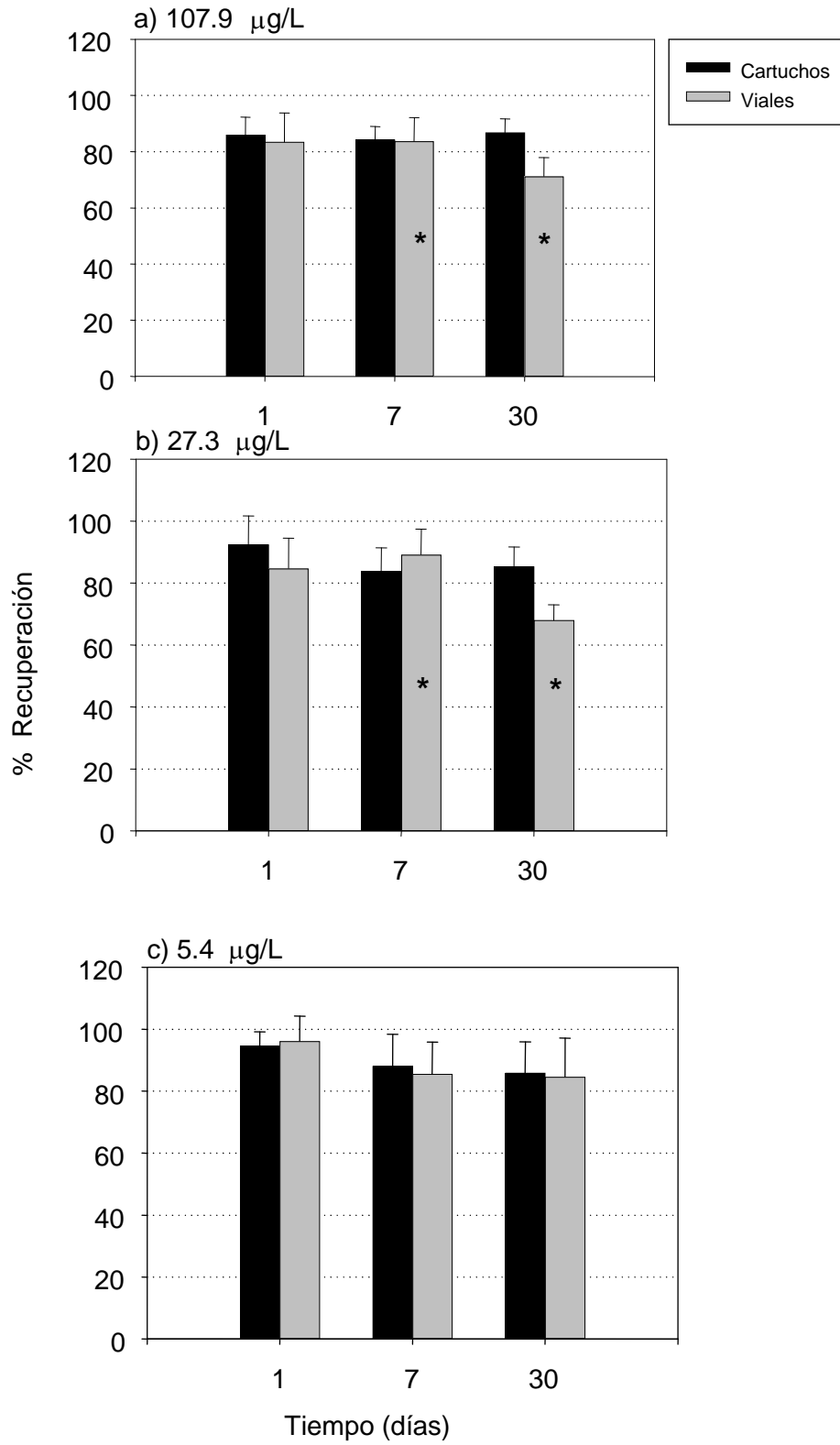


Figura 6.5. Estudio de la estabilidad de estireno tanto en cartuchos como en viales con muestras de orina después de 1, 7, y 30 días de almacenamiento en oscuridad a temperatura ambiente de cartuchos y de viales a -18°C . Valores medios de recuperación y desviación estándar ($n=8$, $*n=6$). (a) $107.9 \mu\text{g/L}$; (b) $27.3 \mu\text{g/L}$; (c) $5.4 \mu\text{g/L}$.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los cartuchos SPE son una buena alternativa para el almacenamiento de muestras de orina, y coinciden con los obtenidos en otros trabajos donde también se ha evaluado el potencial de los cartuchos de SPE para almacenar analitos presentes en muestras de agua. Estudios relacionados con la estabilidad de pesticidas han reflejado que, en general, ésta es mejor cuando se almacenan en cartuchos SPE a -20°C que en la matriz acuosa [39,40]. Sin embargo, otros compuestos, como los antibióticos, se degradaron más deprisa cuando se almacenaron en cartuchos SPE [41].

Tabla 6.11. ANOVA de los datos de almacenamiento. (a) Almacenamiento en cartuchos. (b) Almacenamiento en viales.

(a)

Concentración de estireno: $107.9 \mu\text{g/L}$					
Factor	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	27.35	2	13.673	0.48	0.6227
Dentro grupos	592.50	21	28.214		
Total (Corr.)	619.84	23			
Concentración de estireno: $23.7 \mu\text{g/L}$					
Factor	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	344.36	2	172.182	2.78	0.0851
Dentro grupos	1301.86	21	61.9933		
Total (Corr.)	1646.22	23			
Concentración de estireno: $5.4 \mu\text{g/L}$					
Factor	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	342.93	2	171.464	2.33	0.1219
Dentro grupos	1545.26	21	73.584		
Total (Corr.)	1888.18	23			

(b)

Concentración de estireno: 107.9 µg/L					
Factor	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	626.88	2	313.441	3.96	0.0400
Dentro grupos	1265.97	16	79.123		
Total (Corr.)	1892.86	18			
Concentración de estireno: 23.7 µg/L					
Factor	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	1444.34	2	722.172	10.71	0.0011
Dentro grupos	1078.43	16	67.402		
Total (Corr.)	2522.77	18			
Concentración de estireno: 5.4 µg/L					
Factor	Suma cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	Valor P
Entre grupos	656.09	2	328.046	2.99	0.0721
Dentro grupos	2305.88	21	109.804		
Total (Corr.)	2961.97	23			

Df: grados de libertad.

6.3.4 Estudio de campo

Los resultados de la aplicación del método en el análisis de orina de trabajadores expuestos a estireno se muestran en la Tabla 6.12.

Las concentraciones de estireno coinciden con las obtenidas en otros estudios realizados [4,5]. Con el procedimiento descrito, se pueden determinar concentraciones típicas de estireno en la orina de trabajadores expuestos para la evaluación de la exposición ocupacional a este contaminante.

Tabla 6.12. Concentración de estireno ($\mu\text{g/L}$) después de una semana de la toma de muestras almacenadas a temperatura ambiente.

Trabajador	Concentración de estireno ($\mu\text{g/L}$)
1	27.1
2	44.0
3	76.7
4	33.6
5	70.7
6	32.6
7	61.6
8	11.5
9	24.4
10	16.9
11	21.6
12	89.1
13	57.1

6.4 Conclusiones

El método descrito mediante la utilización de cartuchos SPE ofrece la posibilidad de tomar la muestra de orina directamente en campo, facilitando el transporte de la muestra así como su almacenamiento hasta el análisis en el laboratorio, evitándose las pérdidas de analito. Se ha demostrado una mejor estabilidad de los analitos mediante el almacenamiento en cartuchos SPE que en viales tradicionales. Con el procedimiento descrito, se pueden determinar las concentraciones habituales de estireno en la orina de trabajadores expuestos para la evaluación de la exposición ocupacional a este contaminante. Por todo ello, el dispositivo de muestreo y análisis resulta adecuado para su uso rutinario en la medida de la excreción urinaria de estireno.

6.5 Bibliografía

- [1] I.N.S.H.T. Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España. Ed. INSHT, Madrid, 2013.
- [2] A.C.G.I.H. Threshold limit values (TLVs) for chemical substances and physical agents and biological exposure indices (BEIs). ACGIH, Cincinnati, Ohio, USA.
- [3] K. Pekari, L. Nylander-French, P. Pfäffli, M. Sorsa, A. Aitio, J. Occup. Med. Toxicol. 2 (1993) 115.
- [4] F.Gobba, M.Galasi, S.Ghitori, M. Imbriani, F. Pugliese, A. Cavalleri, Scand. J. Work Environ. & Health 19 (1993) 175.
- [5] I. Ibarra, Control ambiental y biológico de la exposición laboral a estireno. Tesis 2002. Universidad de Murcia. Spain.
- [6] M. Imbriani, S.Ghitori, Int. Arch.Occup. Environ. Health 78 (2005)1.
- [7] M. Stafford, M.G. Horning, A. Zlatkis, J. Chromatogr. 126 (1976) 495.
- [8] R.J. Karwowski, W.H. Braun, J. Chromatogr. 160 (1978) 141.
- [9] G. Pezzagno, S. Guittori, M. Imbriani, E. Capodaglio, Scan. J. Work Environ. Health 11 (1985) 371.
- [10] C.N. Ong, C.Y. Shi, S.E. Chia, S.C. Chua, H.Y. Ong, B.L. Lee, T.P. Ng, K. Teramoto, Am. J. Ind. Med. 25 (1994) 719.
- [11] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, J. Chromatogr. B 848 (2007) 277.
- [12] M.J. Cardador, M. Gallego, J. Chromatogr. B 878 (2010) 1824.
- [13] J.F. Periago, C.Prado, A. Luna, J. Chromatogr. A 719 (1996) 53.
- [14] S. Fustinoni, R. Giampiccolo, S. Pulvirenti, M: Buratti, A. Colombi, J. Chromatogr. B 723 (1999) 105.
- [15] X.-P. Lee, T. Kumazawa, K. Sato, H. Seno, A. Ishii, O. Suzuki, Chromatographia 47 (1998) 593.
- [16] C. Prado, J. Garrido, J.F. Periago, J. Chromatogr. B 804 (2004) 255.
- [17] K.H. Schaller, J. Angerer, H. Drexler, J. Chromatogr. B 778 (2002) 403.
- [18] A. Aitio, in World Health Organization, Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace, WHO, Geneva, 1996, p. 21.
- [19] R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodriguez, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2958.
- [20] J-B Baugros, B. Giroud, G. Dessalces, M-F Grenier-Loustalot, C. Cren-Olivé, J. Anal. Chim. Acta 607 (2008) 191.
- [21] Z.L. Zhang, J.L. Zhou, J. Chromatogr. A 1154 (2007) 205.

- [22] S. Rodríguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 97.
- [23] U. Chiuminatto, F. Gosetti, J.P. Franke, A. Temmink, X-H. Chen, R.A. de Zeeuw, J. Forensic. Sci. 37 (1992) 460.
- [24] N. Ferreiros, G. Iriarte, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, E. Ortiz, J. Sep. Science 31 (2008) 667.
- [25] E. Jagerdeo, M.A. Montgomery, M.A. LeBeau, M. Sibum, J. Chromatogr. B 874 (2008) 15.
- [26] M. Anyusheva, M. Lamers, K. Schwadorf, T. Streck, J. Environ. Anal. Chem. 92 (2012) 799.
- [27] "Uriprel, dispositif de prélèvement et de transport d'urine" INRS. Disponible en <http://www.inrs.fr/accueil/produits/innovation/evaluation-diagnostic/uriprel.html>.
- [28] C.F. Poole, A.D. Gunstilleka, R. Sethuraman, J. Chromatogr. A 885 (2000) 17.
- [29] M-C. Hennion, J. Chromatogr. A 856 (1999) 3.
- [30] C.W. Huck, G.K. Bonn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 51.
- [31] "Sample Preparation, Waters Catalog Chapter" Waters. Disponible en <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/lcSP.pdf>.
- [32] T. Hyötyläinen, M.L. Riekkola, J. Chromatogr. B 817 (2005) 13.
- [33] H. Gao, T. Zhao, Q. Kong, X. Chen, Z. Hu, J. Chromatogr. Sci. 42 (2004) 91.
- [34] F. Sandner, J. Fornara, W. Dott, J. Hollender, J. Chromatogr. B 780 (2002) 225.
- [35] I.N.S.H.T. Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en higiene industrial. MTA/PV-III(2)/98. INSHT, Madrid. 1998.
- [36] EN 482. Workplace atmospheres - General requirements for the performance of procedures for the measurement of chemical agents. 1994.
- [37] NIOSH, Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition, 1998.
- [38] J.C. Miller, J.N. Miller (Eds.), Estadística para Química Analítica. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware, USA, 1993.
- [39] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R.M. Marcé, D. Barceló, Anal. Chim. Acta 386 (1999) 337.
- [40] H. Sabik, R. Jeannot, J. Chromatogr. A 879 (2000) 73.
- [41] E. Turiel, A. Martín-Esteban, G. Bordin, A.R. Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004)123.

Capítulo 7

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

En general la técnica de microextracción en fase sólida puede considerarse de gran aplicabilidad tanto para el control ambiental como para el control biológico de la exposición laboral a compuestos orgánicos volátiles. Se han desarrollado metodologías de toma de muestra y análisis que resultan útiles para ambos tipos de control. Estos métodos permiten aprovechar las ventajas que ofrece SPME al ser una técnica accesible a todos los laboratorios que facilita la toma de muestra, el transporte, la conservación y el análisis de los contaminantes, ya que combina la toma de muestra y la preparación de la muestra en un solo paso. Cuando se elimina el paso de la toma de muestra se puede acelerar todo el proceso analítico, del mismo modo que se pueden evitar todos los errores asociados con las pérdidas de analito debidas a la descomposición o adsorción sobre las paredes del frasco que contiene la muestra y a la manipulación de la muestra. Debido a su naturaleza y a la no utilización de disolventes, SPME se puede acoplar fácilmente a instrumentos analíticos de varios tipos. Esta técnica permite la concentración previa del analito de interés. Sólo los analitos extraídos se introducen en el instrumento. La sensibilidad de las determinaciones utilizando dicha técnica es muy alta, facilitando el análisis de trazas, pues todo el material extraído se transfiere al instrumento analítico.

Por otra parte, la utilización de la extracción en fase sólida para la toma de muestras *in situ* de orina presenta también ventajas, ya que tiene lugar una concentración previa del analito y se evita la manipulación de la muestra, facilitando la toma de muestra, el transporte y la conservación.

A continuación, se resumen más concretamente las conclusiones obtenidas para cada uno de los estudios llevados a cabo.

1. Muestreo pasivo basado en la microextracción en fase sólida para la evaluación de la exposición laboral.

– El muestreador por difusión radial desarrollado basado en SPME, aplicado al control ambiental de la exposición, muestra buena respuesta, tanto con concentraciones constantes como variables en el tiempo, siendo este último caso el más común en ambientes laborales.

– No se han observado efectos estadísticamente significativos de la concentración, el tiempo de muestreo, la humedad relativa, el tiempo de almacenamiento y la velocidad del aire sobre la velocidad de captación por difusión. No tiene lugar ni difusión reversa, ni adsorción competitiva significativa, bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, la temperatura de muestreo sí tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la velocidad de captación. No obstante, la concentración se puede medir correctamente a bajas temperaturas una vez que se recalcula la velocidad de captación por difusión en esas condiciones.

– No se han observado diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante el dispositivo de muestreo desarrollado y el muestreador pasivo de vapores orgánicos 3M-3500 en estaciones de servicio.

– Se ha comprobado que el muestreador desarrollado puede utilizarse para medir las concentraciones esperadas de sevoflurano durante períodos cortos de exposición.

– Los buenos resultados obtenidos en los métodos de toma de muestra y análisis desarrollados para tolueno, clorobenceno y sevoflurano son muy prometedores e indican que el nuevo diseño de muestreador pasivo, basado en SPME, puede proporcionar una herramienta muy útil para el control ambiental de la exposición laboral a contaminantes orgánicos.

2. Aplicación de la microextracción en fase sólida y cromatografía de gases – espectrometría de masas para la determinación de compuestos orgánicos volátiles en la fracción final de aire exhalado.

– El método de toma de muestras y análisis utilizando la técnica de SPME desarrollado permite llevar a cabo el control biológico de compuestos orgánicos mediante su análisis en la fracción final de aire exhalado debido a la significativa correlación existente entre la concentración ambiental y la concentración en el aire exhalado de los compuestos de interés.

– El método evaluado resulta accesible ya que evita la necesidad de complejos equipos de toma de muestras de la fracción de aire alveolar, y de la instrumentación adicional para la desorción térmica.

– El método desarrollado permite el análisis repetido de una misma muestra.

- El método desarrollado resulta preciso, lineal y sensible en el rango de concentraciones de interés para el campo ocupacional.

3. Desarrollo y optimización de un método para el control biológico de cetonas (acetona, metiletilcetona y metilisobutilcetona) y tetrahidrofurano en orina mediante microextracción en fase sólida.

- Los resultados obtenidos con el método desarrollado mediante la técnica SPME para la determinación simultánea en orina de tres cetonas, acetona, MEK y MIBK, y de THF, todos sin metabolizar, coinciden con los obtenidos con el método HS-GC-MS automatizado. Sin embargo, este último conlleva la necesidad de disponer de un equipo específico y más complejo para el análisis.

- Las condiciones se han optimizado utilizando el diseño experimental, teniendo en cuenta las interacciones entre los factores que afectan al proceso de extracción.

- Los límites de detección obtenidos son lo suficientemente bajos para la aplicación del método para el control biológico de la exposición laboral.

- El método desarrollado se ha comprobado mediante la participación en un programa de intercomparación externo para análisis toxicológicos en muestras biológicas (G-EQUAS). Los resultados obtenidos muestran un buen acuerdo con los valores de referencia.

4. Aplicación de la técnica de extracción en fase sólida – cromatografía de gases – espectrometría de masas para el muestreo y determinación de estireno sin metabolizar en orina.

- El método desarrollado basado en la aplicación de la técnica de SPE permite la toma de muestra en campo y la determinación de estireno sin metabolizar en la orina de trabajadores expuestos. Los cartuchos de adsorbente SPE utilizados permiten un fácil transporte de las muestras de orina al laboratorio.

- Los resultados obtenidos indican que los cartuchos SPE son una buena alternativa para el almacenamiento de muestras de orina. Se ha demostrado una mejor estabilidad de los analitos mediante el almacenamiento en cartuchos SPE que en viales tradicionales.

- Las condiciones se han optimizado utilizando el diseño experimental, teniendo en cuenta las interacciones entre los factores que afectan al proceso de extracción.
- Los valores obtenidos de la desviación estándar relativa y del sesgo relativo cumplen los requisitos intralaboratorios propuestos en el protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en higiene industrial.
- Pueden utilizarse volúmenes más grandes de orina si se requiere mayor sensibilidad.
- Los buenos resultados obtenidos indican que el método de toma de muestra puede ser aplicable a la determinación de otros disolventes orgánicos.