

DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y AROMÁTICOS
VOLÁTILES EN MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES DE UNA FÁBRICA
DE CALZADO DE BUCARAMANGA.

JOSÉ LUIS ORTIZ QUIÑONES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006

DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y AROMÁTICOS
VOLÁTILES EN MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES DE UNA FÁBRICA
DE CALZADO DE BUCARAMANGA.

JOSÉ LUIS ORTIZ QUIÑONES

Trabajo presentado como requisito
parcial para optar al título de químico

Directora: Dra. Elena E. Stashenko,
Química, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006

*Lo más lindo que tiene la vida son
las personas con el corazón lleno de
nobleza y que siempre piensan en
la felicidad de los demás.*

DEDICATORIA

A mis papas Evelio y Carmen Rosa por todo su Sacrificio y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mis hermanos Horacio, Juan Pablo, Martha Cecilia y Elias por sus consejos y confianza infinita que han depositado en mi.

A todas las personas que tanto quiero y que son la fuente de mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera especial a todas las personas que hicieron posible mi formación académica y como persona en la UIS.

A la doctora Elena E. Stashenko por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el Laboratorio de Cromatografía, por creer en mi, por compartir sus vivencias, sus experiencias y sus conocimientos para prepararme para la vida.

Al doctor Jairo René Martínez por sus aportes a mi tesis, especialmente en la parte fisicoquímica y estadística, y su contribución como docente universitario.

Al estudiante de doctorado Amner Muñoz por su dedicación a mi formación como químico y como persona.

A Mónica Niño, Ciro Eduardo, Amanda Lucía Mora, Martha Cervantes, Geovana Tafur, Katerine Blanco, Martha Barrera, Alberto Sánchez, Fabio Muñoz y Emerson Delgado por acompañarme en los momentos difíciles, por tener tanta confianza en mi y por ser personas tan maravillosas.

A mis paisanos y amigos José Alberto, William, María Teresa, Jackson y Oscar Ariza por su Amistad y apoyo.

A Arnold Romero, Omar Guerra, Walter Rays, María Teresa, Camilo Durán, Elkin Rueda, Diana Angarita, José Luis Molina, William Salgar, Deyanira Caballero, Víctor Pérez, Hans Castro, Libia, Sergio Ordóñez y Carlos Alberto Ruiz por ser mis amigos y acompañarme durante la mayor parte de mi carrera universitaria.

A todos los compañeros de CIBMOL Y CENIVAM, Adriana, Jenny, Leslie, Lucía, Martín, William, Miguel, Alejandro, Andrea, Luz Adriana, Germán, Natalia, Adriana Vargas, Gregorio, Tomas, Johan, Diana, Johana, Carol Yoraine, Deiny, Edwin, Lalo, Stella, Sandra, Fabián, Martha, Olga, Saydé, Herman, Ingrid, Laura, Cristina.....

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BEI	<i>Biological Index Exposure</i> (Índice de exposición biológica)
BLLE	<i>Batch Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido por lotes)
BTEX's	Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos
CV	Coefficiente de Variación
GC	<i>Gas Chromatography</i> (cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto)
GC-FID	<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas Prácticas de Laboratorio)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución o cromatógrafo de gases de alta resolución, según el contexto)
K_{fs}	Constante de distribución entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra
S-HS	<i>Static Headspace</i> (<i>Headspace</i> estático)
HS-SPME	<i>Headspace-Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>)
ISTD	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)
LLE	<i>Liquid – Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
NMC	Nivel mínimo de cuantificación
NMD	Nivel mínimo de detección

PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PMA	<i>Phenyl Mercapturic Acid</i> (Ácido fenilmercaptúrico)
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
RDL	Rango dinámico lineal
R_f	<i>Response Factor</i> (Factor de respuesta)
RR_f	<i>Relative Response Factor</i> (Factor de respuesta relativo)
SNC	Sistema nervioso central
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TCD	Detector de conductividad térmica
t_R	Tiempo de retención
t_{RR}	Tiempo de retención relativo
ttMA	<i>trans, trans-Muconic Acid</i> (Ácido <i>trans, trans</i> -mucónico)
VOC's	<i>Volatile Organic Compounds</i> (Compuestos orgánicos volátiles)

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Concentración de metabolitos de <i>n</i> -hexano en la orina de trabajadores expuestos a este hidrocarburo en el aire (182 mg/m ³).	18
Tabla 2	Umbrales establecidos para los BTEX en el aire de una industria o en el aire ambiental.	20
Tabla 3	Concentraciones de tolueno en tejidos o fluidos biológicos, en 8 especímenes humanos <i>postmortem</i> (mg/L o mg/kg).	23
Tabla 4	BTEX's e hidrocarburos alifáticos de interés utilizados para la selección de la programación de temperatura del horno del cromatógrafo.	30
Tabla 5	Temperaturas empleadas para el análisis cromatográfico de los patrones y extractos de orina, obtenidas por las técnicas HS-SPME y S-HS.	31
Tabla 6	Solución <i>stock</i> de hidrocarburos disueltos en metanol.	32
Tabla 7	Concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, utilizadas en la técnica HS-SPME/HRGC/FID.	32
Tabla 8	Concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, utilizadas en la técnica S-HS/HRGC/FID.	33
Tabla 9	Especificaciones del material de laboratorio descrito en 3.3	35
Tabla 10	Tiempos utilizados en el automuestreador S-HS para el análisis cromatográfico de las muestras de orina.	40
Tabla 11	Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos para el tolueno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).	50

	Pág.	
Tabla 12	Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos para el tolueno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).	50
Tabla 13	Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas para tolueno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).	51
Tabla 14	Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas para tolueno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno)	51
Tabla 15	Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y <i>o</i> -xileno, bajo diferentes condiciones.	53
Tabla 16	Estudio de la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μ m) del tolueno y (<i>m</i> - + <i>p</i> -) xilenos, modificando las condiciones de extracción.	54
Tabla 17	Condiciones de extracción de los hidrocarburos alifáticos y BTEX's por las técnicas HS-S y HS-SPME.	61
Tabla 18	Niveles mínimos de detección del método (μ g/L), de los hidrocarburos presentes en muestras de orina obtenidos por S-HS/GC/FID y HS-SPME/GC/FID.	62
Tabla 19	Límites de detección en la determinación de BTEX`s en orina, obtenidos por los investigadores [3, 10, 18, 28], utilizando sistemas analíticos similares.	63
Tabla 20	Curva de calibración (ecuación) para los hidrocarburos bajo estudio, empleada para su cuantificación por la técnica HS-SPME/HRGC/FID.	64
Tabla 21	Concentración (μ g/L) de tolueno, etilbenceno y <i>m</i> -xileno en muestras de orina de trabajadores de una fábrica de calzado, aislados y cuantificados por HS-SPME/HRGC/FID.	67
Tabla 22	BEI's para algunos hidrocarburos en muestras de orina.	68

Tabla 23	Concentración de BTEX's y <i>n</i> -hexano en el aire al interior de la fábrica de calzado.	69
Tabla 24	Niveles mínimos de detección de BTEX's, <i>n</i> -hexano, <i>n</i> -heptano y ciclohexeno en aire y sus concentraciones, determinadas en el aire al interior de la fábrica de calzado.	70

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estructura de cinco metabolitos del benceno.	6
Figura 2	Estructura de los ácidos hipúrico y <i>m</i> -, <i>p</i> - y <i>o</i> - metilhipúricos.	6
Figura 3	Ilustración esquemática del dispositivo para realizar HS-SPME.	13
Figura 4	Biotransformación del benceno.	21
Figura 5	Biotransformación del tolueno.	24
Figura 6	Biotransformación del etilbenceno.	25
Figura 7	Biotransformación de los xilenos.	26
Figura 8	Automuestreador <i>Headspace sampler</i> HP 7694E unido al cromatógrafo en línea.	39
Figura 9	Sistema de muestreo, M18 <i>VacBag Sampler System</i> , SK-M180.	44
Figura 10	Adición de la mezcla de hidrocarburos a la bolsa <i>Tedlar</i> .	45
Figura 11	Exposición de la fibra de PDMS (100 μ m) al contenido de la bolsa <i>Tedlar</i> .	45
Figura 12	Muestras de aire al interior de la fábrica de calzado en: (a) el aire alejado de los recipientes de pegamento y (b) zona de respiración de los trabajadores.	47
Figura 13	Perfil cromatográfico típico de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos usados en la estandarización de las condiciones de extracción, por las técnicas S-HS y HS-SPME. 1- <i>n</i> -hexano; 2- Benceno; 3- Ciclohexeno; 4- Metanol; 5- <i>n</i> -Heptano; 6- Tolueno; 7- Etilbenceno; 8- <i>p</i> -Xileno; 9- <i>m</i> -Xileno; 10- <i>o</i> -Xileno; 11- Clorobenceno (Istd).	50
Figura 14	Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y <i>o</i> -xileno, bajo diferentes tiempos de termostatación del <i>vial</i> .	56

	Pág
Figura 15	56
Figura 16	57
Figura 17	57
Figura 18	58
Figura 19	58
Figura 20	59
Figura 21	59
Figura 22	60
Figura 23	60
Figura 24	61
Figura 25	61

Figura 26 Perfil cromatográfico típico de los compuestos presentes en la fase vapor de una muestra de orina de un trabajador de la fábrica de calzado bajo estudio, aislados por HS-SPME y analizados por HRGC-FID, utilizando una columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52 μm (f.e.).

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Encuesta realizada a los 12 trabajadores que suministraron las muestras de orina	81
Anexo 2 Compuestos presentes en el <i>headspace</i> del pegante "PC-2000", analizados por HS-SPME/GC-MS.	85
Anexo 3 Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos de los BTEX'S e hidrocarburos alifáticos volátiles, aislados por S-HS (Istd = clorobenceno)	91
Anexo 4 Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos volátiles, aislados por HS-SPME (Istd: clorobenceno).	96
Anexo 5 Estudio de la reproducibilidad de áreas para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos volátiles, aislados por S-HS.	101
Anexo 6 Estudio de la reproducibilidad de las áreas para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos volátiles, aislados por HS-SPME.	107
Anexo 7 Estudio de la eficiencia de extracción para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos volátiles, aislados por SHS, al modificar las condiciones de extracción.	112
Anexo 8 Estudio de la eficiencia de extracción para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos volátiles, aislados por HS-SPME modificando las condiciones de extracción.	109
Anexo 9 Perfiles cromatográficos del blanco del solvente (metanol) y de la orina, analizada por HS-SPME/HRGC-FID (PDMS, 100 μ m). Columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52 μ m (f.e.).	125
Anexo 10 Curvas de calibración y límites de detección para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos en muestras de aire.	128

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCION	1
2	MARCO TEÓRICO	5
2.1	ANTECEDENTES	5
2.1.1	Metabolitos de BTEX's en la orina	5
2.1.2	BTEX's en la orina	7
2.1.3	BTEX's en agua	8
2.1.4	BTEX's en aire	10
2.2	FUNDAMENTO TEÓRICO	10
2.2.1	Cromatografía de gases	10
2.2.2	Detector	11
2.2.3	Técnicas de preparación de muestras	12
2.2.3.1	Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>	12
2.2.3.2	Extracción líquido-líquido	15
2.2.3.3	<i>Headspace</i> estático	16
2.2.4	Hidrocarburos alifáticos y BTEX's	17
2.2.4.1	Hidrocarburos alifáticos	17
2.2.4.2	Benceno	19
2.2.4.3	Tolueno	22
2.2.4.4	Etilbenceno	24
2.2.4.5	Xilenos	26

3	PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1	REALIZACIÓN DE LA ENCUESTA A LOS TRABAJADORES QUE LABORAN EN LA MANUFACTURA DEL CALZADO.	28
3.2	ANÁLISIS DEL <i>HEADSPACE</i> DEL PEGANTE “PC-2000” POR HS-SPME/HRGC-MSD.	28
3.3	SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO GC-FID	29
3.4	DETERMINACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN ABSOLUTOS Y RELATIVOS, ÁREAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS.	31
3.5	ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICA DE EXTRACCIÓN HS-SPME.	33
3.5.1	Descripción de las condiciones experimentales de la técnica	33
3.5.2	Estudio del efecto de agitación sobre la eficiencia de la extracción	36
3.5.3	Estudio del efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de la extracción	37
3.5.4	Estudio del efecto del pH y <i>salting-out</i> sobre la eficiencia de la extracción	37
3.5.5	Estudio del efecto de la temperatura del <i>vial</i> sobre la eficiencia de la extracción	37
3.6	ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN S-HS	38
3.6.1	Descripción de las condiciones experimentales de la técnica	38
3.6.2	Estudio de los efectos del tiempo y temperatura de termostatación del <i>vial</i> sobre la eficiencia de extracción	40
3.6.3	Estudio del volumen de orina, efecto del pH y <i>salting-out</i> sobre la eficiencia de extracción	41
3.7	OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS BTEX’s E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÍNIMOS DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	41

	Pág.
3.8 TOMA DE MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES DE UNA FÁBRICA DE CALZADO Y APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	42
3.9 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN EL AIRE, AL INTERIOR DE LA FÁBRICA DE CALZADO	43
4 ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
4.1 REALIZACIÓN DE LA ENCUESTA A LOS TRABAJADORES, QUE LABORAN EN LA MANUFACTURA DEL CALZADO	48
4.2 ANÁLISIS DEL <i>HEADSPACE</i> DEL PEGANTE "PC-2000" POR HS-SPME/HRGC-MSD	48
4.3 SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO GC-FID	49
4.4 DETERMINACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN ABSOLUTOS Y RELATIVOS, ÁREAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS	49
4.5 ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN HS-SPME Y S-HS	53
4.6 OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÍNIMOS DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	62
4.7 APLICACIÓN DE HS-SPME/HRGC/FID PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES, QUE LABORAN EN LA MANUFACTURA DEL CALZADO	66

4.8	MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN EL AIRE, AL INTERIOR DE LAS FÁBRICAS DE CALZADO	69
5	CONCLUSIONES	72
	RECOMENDACIONES	74
	BIBLIOGRAFÍA	75
	ANEXOS	80

Determination, by means of S-HS, HS-SPME and HRGC-FID, of volatile aliphatic and aromatic hydrocarbons in urine samples of footwear factory workers*

José Luis Ortiz Quiñones**

Key words: BTEX's, glue, urine, HS-SPME/GC-FID, S-HS/GC-FID, shoes factory.

Benzene, toluene, ethylbenzene and the three xylenes isomers (BTEX), together with volatile aliphatic Hydrocarbons are used in many industrial activities. Examples of these applications are the makings of paintings, enamels, lacquers, resins, inks, thinners, glues and organic synthesis, among others. The majority of these compounds, in certain quantities, produces harmful effects on the organism. Their presence in the human body has been related to diverse and complicated pathologies (Leukemia, neoplasia, loss of visual keenness, perturbations in the sensory function and in the memory, colvulsions, cerebral ataxia, and dementia), being the brain one of the organs more strongly affected. For the case of toluene exists a direct relation between its quantity in semen and its liquefaction time, affecting sperm motility.

During footwear manufacture, these compounds arise from the glues and spread throughout the factory, where the workers are exposed to them directly or indirectly, during the working day (7 a.m. – 7 p.m.).

In this methodology, the headspace analytical techniques, S-HS AND HS-SPME were used with capillary gas chromatography and flame ionization detection (HRGC/FID), for the extraction and quantification of volatile aliphatic and aromatic hydrocarbons in air of a footwear factory and in samples of urine from 12 workers of the factory. The methodology employed followed the methods EPA 5021 st and ASTM D 6520-00. HS-SPME/HRGC/FID presented minimum detection levels for the quantification of BTEX's in urine samples lower than S-HS/HRGC/FID. The compounds determined in the urine samples of were toluene(15-183 µg/L), ethylbenzene (1-2 µg/L) y *m*-xylene (1-4 µg/L). Other analytes of interest were found at concentrations below the detection limits of these analytical procedures. Compounds quantification was performed by means of HS-SPME/HRGC/FID.

* Undergraduate thesis

** Science Faculty, Chemistry, Director: Dra. Elena E. Stashenko

Determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos volátiles en muestras de orina de trabajadores de una fábrica de calzado de Bucaramanga*.

José Luis Ortiz Quiñones**

Palabras claves: BTEX's, pegante, orina, HS-SPME/GC-FID, S-HS/GC-FID, fábrica de calzado.

Los BTEX's (benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno) junto con los hidrocarburos alifáticos volátiles se emplean en muchas actividades industriales como por ejemplo en la elaboración de pinturas, esmaltes, lacas, resinas, tintas, *thinners*, pegamentos y en síntesis orgánica, entre otras. La mayoría de estos compuestos al ingresar al cuerpo humano, en ciertas cantidades, producen efectos nocivos sobre el organismo conllevando a diversas y complicadas patologías (leucemia, neoplasia, pérdida de agudeza visual, perturbaciones en la función sensorial y en la memoria, convulsiones, ataxia cerebral y demencia), siendo el cerebro uno de los órganos más fuertemente afectado. Para el caso del tolueno, existe una correlación directa entre la cantidad de esta sustancia presente en el semen y el tiempo de licuefacción, repercutiendo en la motilidad espermática.

En el proceso de manufactura de calzado, estos compuestos emanan de los pegamentos y se dispersan en la fábrica, donde los trabajadores se exponen a ellos directa o indirectamente, durante su jornada laboral.

En esta metodología se emplearon técnicas de análisis *headspace* (S-HS y HS-SPME) y cromatografía gaseosa capilar con detector de ionización en llama (HRGC/FID), para la extracción y cuantificación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos volátiles en muestras de aire de una fábrica de calzado y en muestras de orina de la fábrica, basados en los métodos EPA 5021A y ASTM D 6520-00. HS-SPME/HRGC/FID presentó límites de detección más bajos para la cuantificación de BTEX's en muestras de orina. Los compuestos determinados en las muestras de orina fueron el tolueno (15-183 µg/L), etilbenceno (1-2 µg/L) y *m*-xileno (1-4 µg/L). Los demás analitos de interés se encontraron por debajo de los niveles mínimos de detección y cuantificación. La cuantificación de los compuestos bajo estudio se realizó por HS-SPME/HRGC/FID.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Química, Directora: Dra. Elena E. Stashenko

1. INTRODUCCIÓN

Los BTEX's (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) e hidrocarburos alifáticos aparecen acompañando muchas actividades industriales, entre las cuales se encuentran la elaboración de pinturas, esmaltes, lacas, resinas, tintas, *thinners*, pegamentos y en síntesis orgánica, entre otras. Estos compuestos, en cantidades apreciables (*i.e.* benceno > 4 ppm; etilbenceno, tolueno y los xilenos > 200 ppm; *n*-hexano > 450 ppm; *n*-heptano > 1000 ppm) [39] dentro del cuerpo humano, producen efectos nocivos sobre el organismo, tales como leucemia, neoplasia, pérdida de agudeza visual, perturbaciones en la función sensorial y en la memoria, convulsiones, ataxia cerebral y demencia. En general, el cerebro es uno de los órganos más fuertemente afectados por los BTEX's [5, 8, 37].

Los hidrocarburos aromáticos, en particular los BTEX's, han adquirido una gran relevancia como compuestos contaminantes tanto dentro como fuera de las viviendas. Dos fuentes relevantes de estos compuestos son el tráfico vehicular y el humo del tabaco [3].

En el proceso de manufactura del calzado, los trabajadores están expuestos a estos hidrocarburos, presentes en el aire. Los BTEX's entre otras sustancias, son emanadas de los pegamentos, se inhalan por los trabajadores y, por tanto, pueden producir los efectos nocivos, anteriormente mencionados.

Hasta la fecha (febrero del 2006), se han realizado varios trabajos con el objeto de cuantificar BTEX's e hidrocarburos alifáticos en muestras de orina y sangre. La mayoría de estos trabajos no determinan directamente el hidrocarburo sin metabolizar, excretado por la orina, sino que realizan la medición de algunos de sus metabolitos. La justificación para trabajar con los metabolitos y no

directamente con los hidrocarburos, se debe a que los metabolitos presentan en la orina una concentración muy superior a la del compuesto sin metabolizar.

Las determinaciones de analitos en sangre, implican el riesgo de trabajar con una matriz que, eventualmente, puede estar infectada con el VIH u otros microorganismos y virus. Igualmente, la adquisición de sangre para cuantificar un determinado compuesto o metabolito es un método invasivo y, por consiguiente, puede acarrear problemas legales. Lo anterior podría evitarse trabajando con una matriz como la orina, que, además, presenta un menor grado de complejidad, en cuanto a su composición química, en comparación con la de la sangre.

Se desconoce por partes de dueños de las fábricas de calzado en Bucaramanga, que el aire, que rodea el sitio donde se lleva a cabo la manufactura del calzado, presenta una alta contaminación, por causa de algunos compuestos orgánicos volátiles, VOC's, que emanan de los pegamentos. Sumado a esto, la indumentaria de protección que actualmente están usando las personas involucradas en la manufactura del calzado, contra los VOC's, que emanan los pegamentos, no es adecuada. A pesar de todo lo anterior, hasta la fecha (diciembre del 2005), en Colombia aún no se ha estandarizado y validado un método cromatográfico para el análisis de BTEX's e hidrocarburos alifáticos presentes en muestras de orina de trabajadores.

Por esta razón fue imperiosa la necesidad de implementar y estandarizar una técnica analítica asequible y confiable para la determinación de BTEX's e hidrocarburos alifáticos en un fluido biológico de fácil consecución como lo es la orina.

El método implementado se aplicó a la determinación cuantitativa de BTEX's y algunos hidrocarburos alifáticos en muestras de orina de trabajadores de la fábrica de calzado, expuestos a ellos. Lo anterior se hace con base en la posible

existencia de una relación entre la concentración de estos compuestos en la orina y en el aire del sitio de trabajo. Los siguientes compuestos fueron encontrados en las muestras de orina: el tolueno (15-183 $\mu\text{g/L}$), etilbenceno (1-2 $\mu\text{g/L}$) y *m*-xileno (1-4 $\mu\text{g/L}$); los demás analitos de interés se encontraron por debajo de los niveles mínimos de detección y cuantificación; la concentración del tolueno en la orina fue de 2 a 3 veces más alta al término de la jornada laboral en comparación con la del inicio de la jornada.

Con la realización de este proyecto se llevó a cabo, no sólo la investigación científica, sino una labor de tipo social, puesto que se demostró experimentalmente, tanto a empresarios como a trabajadores del sector del calzado, los riesgos ocupacionales a cuales ellos están expuestos en su lugar de trabajo. Lo anterior se logró con base en los resultados obtenidos para las concentraciones de los compuestos determinados tanto en el aire, como en la orina y, teniendo en cuenta los reportes de la literatura en cuanto a la correlación "concentración-perjuicios sobre la salud", para cada uno de los compuestos analizados.

Este trabajo está estructurado en 4 capítulos (Introducción, Marco Teórico, Parte Experimental y Análisis de Resultados); los primeros dos capítulos están redactados con base en una revisión de 49 referencias bibliográficas. Los dispositivos y equipos empleados, esquemas de las rutas de metabolización de algunos hidrocarburos, y algunos de los cromatogramas más relevantes, obtenidos durante el desarrollo de la tesis, se presentan en 26 figuras distribuidas en todo el texto. Los resultados generados durante el desarrollo de la parte experimental, junto con otros datos necesarios para propósitos de comparación, reportados por otros autores [3, 5, 10, 18, 28, 38], se presentan en 24 tablas y 9 Anexos.

Los resultados de esta investigación fueron presentados en modalidad de *póster*, bajo los títulos “*Comparación de S-HS y HS-SPME en la determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos volátiles en muestras de orina de trabajadores de una fábrica de calzado*”, en el XIII Congreso Colombiano de Química, realizado durante los días 15 al 17 de octubre de 2004 en la ciudad de Cartagena, Colombia; “*Determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos volátiles en muestras de orina de trabajadores de una fábrica de calzado, empleando las técnicas S-HS, HS-SPME y HRGC/FID*”, en el VII Simposio Internacional sobre Avances en Tecnologías de Extracción, ExTech, realizado durante los días 13 al 15 de noviembre de 2005 en la ciudad de Campinas, Brasil y, además, se presentarán en el XIV Congreso Colombiano de Química, a realizarse durante los días 25 al 27 de mayo del 2006 en la ciudad de Armenia, Colombia. Se planea también publicar los resultados en la *Revista Colombiana de Química*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Metabolitos de BTEX's en la orina

Ong y colaboradores (1995) [32] determinaron la concentración de benceno y algunos de sus metabolitos en la orina (i.e. ácido *trans,trans*-mucónico, ttMA, catecol, hidroquinona y fenol; Véase **Figura 1**), de 64 trabajadores expuestos a una concentración de benceno en aire entre 0.12 y 68 ppm. Se encontró, que entre el benceno sin metabolizar y sus metabolitos, todos eliminados por la orina, el ttMA presentó la mejor correlación con la concentración de benceno en el aire. Al comparar entre tres metabolitos fenólicos del benceno en orina (fenol, catecol e hidroquinona), para determinar indirectamente la concentración del benceno en el aire, se encontró que la hidroquinona presentaba los resultados más confiables.

Por su parte, Inoue y colaboradores [17] desarrollaron un método, basado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para la cuantificación de ácido fenilmercaptúrico (PMA) en orina (Véase **Figura 1**), el cual estaba relacionado, linealmente, con la concentración de benceno en aire. Se estableció, que la concentración de PMA en orina, después de 8 horas de exposición al benceno (100 ppm), alcanzó 6,4 mg/L [17].

Kongtip y colaboradores [19] realizaron un estudio en trabajadores expuestos a tolueno y a xilenos, monitoreando ácido hipúrico y los ácidos *o*-, *m*-, y *p*-metilhipúricos en la orina (Véase **Figura 2**). Estos metabolitos fueron derivatizados a sus correspondientes ésteres metílicos y, posteriormente, se analizaron por cromatografía de gases. Los resultados obtenidos por este método cromatográfico

concordaron muy bien con los obtenidos por cromatografía líquida de alta eficiencia.

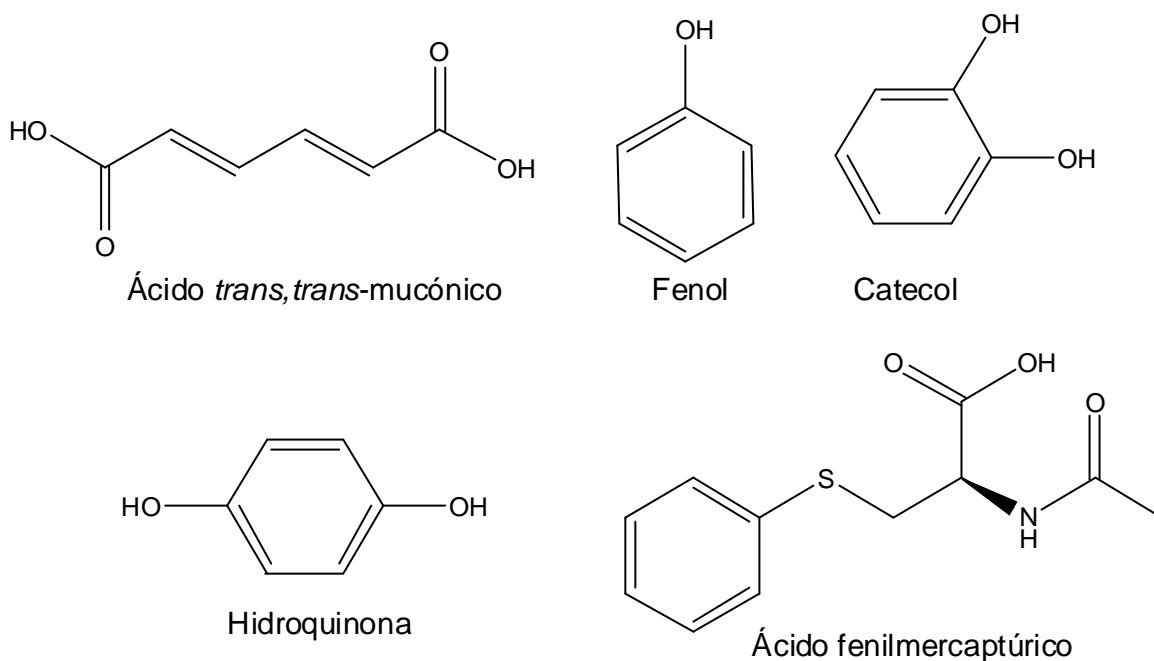


Figura 1. Estructura de cinco metabolitos del benceno.

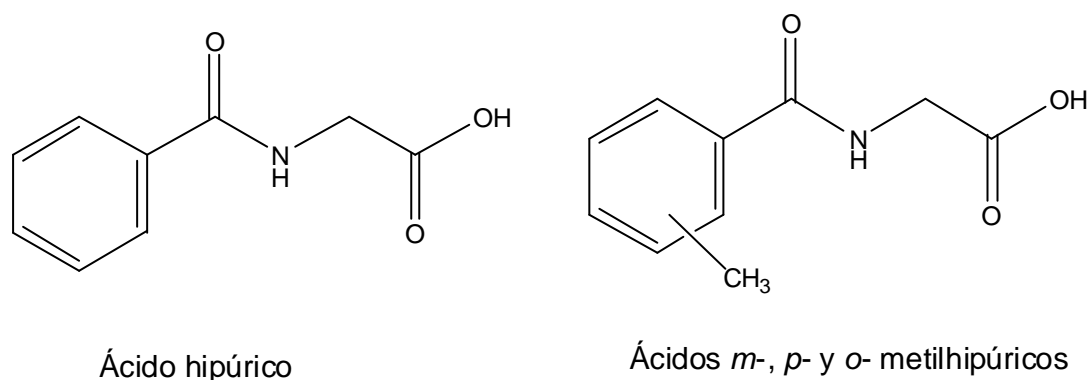


Figura 2. Estructura de los ácidos hipúrico y *m*-, *p*- y *o*- metilhipúricos.

Kumar y colaboradores [22] realizaron un monitoreo de la orina de trabajadores expuestos a solventes industriales que contienen tolueno y xilenos. En este

estudio, se encontró un incremento notable en la cantidad del ácido hipúrico y ácidos *o*-, *m*-, y *p*-metilhipúricos en la orina. Se estableció, que la formación de estos metabolitos es afectada por factores como la edad, consumo de alcohol, hábitos de fumar, duración de la exposición y condiciones de higiene industrial. Los niveles de los metabolitos urinarios fueron más bajos en trabajadores que ingerían alcohol con frecuencia. Se presentó un incremento en la cantidad del ácido hipúrico en la orina en personas que tenían hábitos de fumar. Con respecto a la edad, se encontró un incremento de estos metabolitos en trabajadores con edades entre 40 y 45 años.

2.1.2 BTEX's en la orina

Manini y colaboradores (1999) [28] determinaron BTEX's en orina y sangre, en personas expuestas a los contaminantes presentes en el aire de una área urbana, utilizando microextracción en fase sólida, como técnica de extracción, y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SPME/GC-MS) como método instrumental. Este estudio mostró, que al correr por dos horas dentro de una área urbana, con un ambiente contaminado, se observa un incremento apreciable de BTEX's en la orina. La linealidad del método fue establecida para concentraciones superiores a 50 ppb.

Nam y colaboradores [30] compararon las técnicas HS-SPME y *headspace* convencionales para la determinación de tolueno en orina de personas que con frecuencia inhalaban los vapores de algunos pegamentos. El límite de detección de tolueno en orina con la técnica HS-SPME fue 10 veces más bajo que el alcanzado con las técnicas *headspace* estático (S-HS). Las concentraciones del tolueno determinadas por las dos técnicas presentaron una buena correlación: El coeficiente de correlación entre los dos conjuntos de valores fue de 0.98%.

Yeshvandra y colaboradores [48] realizaron un monitoreo del tolueno en la orina, en trabajadores que laboran en la industria del calzado. Se determinó la concentración de ácido hipúrico en la orina y se encontró un considerable aumento de éste cuando se incrementaba el período de exposición a un determinado pegamento. También, se realizó el monitoreo en fumadores y personas que ingieren alcohol; se concluyó que el cigarrillo y el alcohol aumentaban la excreción de ácido hipúrico, contrario a lo reportado por Kumar y colaboradores [22] para el caso del alcohol.

2.1.3 BTEX's en agua

Floréz y colaboradores [9] determinaron BTEX's en muestras acuosas por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), utilizando tres técnicas de muestreo, a saber: *Headspace* estático (S-HS), microextracción en fase sólida (SPME) y microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME), usando una fibra de poli(dimetilsiloxano). En este trabajo, se hizo una comparación detallada de las características de la eficiencia analítica de S-HS, SPME y HS-SPME, como técnicas de muestreo, y el posterior análisis de BTEX's por cromatografía de gases con FID. Para las tres técnicas analíticas se encontró que la adición de sal a las muestras de agua, para aumentar la fuerza iónica, produjo un aumento en la eficiencia de extracción para el benceno y, al contrario, su disminución para el tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno. El tiempo requerido para el análisis fue de 25 min para S-HS, 10 min para SPME y 4 minutos para HS-SPME. El límite de detección más bajo se obtuvo para la técnica HS-SPME. La agitación de la muestra acuosa a 900 rpm mejoró ostensiblemente la eficiencia de extracción.

Santa y colaboradores [41,42] realizaron una comparación entre cuatro técnicas de extracción, a saber: las extracciones líquido-líquido (LLE) continua y por lotes,

extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y *headspace* estático (S-HS), con el propósito de determinar las eficiencias de recuperación y la reproducibilidad, variando tiempo y técnicas de extracción, tipo de solvente y otros parámetros para el análisis y cuantificación de hidrocarburos en aguas residuales, utilizando cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID). Las técnicas de microextracción en fase sólida (SPME) y *headspace* estático (S-HS) presentaron resultados similares en la determinación de hidrocarburos totales. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 72 y el 96%, utilizando adición de sal (NaCl) al 20 % (p/v) y pH 11.

Kubinec y colaboradores [21] desarrollaron y validaron un método, libre de disolvente, para la extracción de BTEX's en muestras acuosas, mediante la utilización de un dispositivo consistente en un sorbente (Porapak Q) empacado dentro de un capilar, junto con una trampa de alúmina húmeda. Los límites de detección y de cuantificación de BTEX's analizados, utilizando este dispositivo, fueron similares a los obtenidos por los métodos de purga y trampa convencionales. La principal ventaja de utilizar este dispositivo, con Porapak Q, en comparación con la técnica de purga y trampa tradicional, radica principalmente en el costo más bajo de análisis y en la posibilidad de muestrear directamente en el sitio contaminado.

Yang y colaboradores [47] realizaron un análisis *headspace* de aguas subterráneas contaminadas con BTEX's, para determinar las ventajas y limitaciones de usar una fibra de Carboxen-PDMS. Aunque la respuesta cromatográfica era mucho más alta para la fibra de Carboxen-PDMS, en comparación con la de PDMS convencional, se observó una notable reducción de la cantidad de analito extraído bajo condiciones de mezclas multicomponente, debido a procesos de desplazamiento. La afinidad de los analitos por la fibra de Carboxen-PDMS aumentaba en el siguiente orden: xileno > etilbenceno > tolueno

> benceno. En la matriz multicomponente, la cantidad extraída de benceno y tolueno disminuyó ligeramente con el tiempo, mientras que para el etilbenceno y los xilenos se observó un pequeño aumento.

2.1.4 BTEX's en aire

Rubiano y colaboradores [40] determinaron los niveles de BTX's en el aire de una industria de pinturas de Bogotá, utilizando cartuchos rellenos con carbón activado para atrapar los compuestos y, disulfuro de carbono, para su extracción; como técnica de análisis se utilizó cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID). Se encontraron concentraciones de BTX's en aire que variaron entre no detectable y 55,1 mg/m³, para benceno; entre 18,3 y 253 mg/m³, para tolueno; y entre 11.8 y 122.2 mg/m³, para xilenos. Se encontró, que existe un riesgo ocupacional por benceno en algunos puestos de trabajo, lo cual es preocupante, si se tiene en cuenta que éste no es utilizado como materia prima en la fabricación de pinturas. Se determinó, que existe riesgo ocupacional en la mayoría de los puestos de trabajo de la industria estudiada, cuando se considera la mezcla de los tres disolventes.

2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.2.1 Cromatografía de gases. La cromatografía de gases es la técnica analítica preferida para la determinación de contaminantes volátiles y semivolátiles en mezclas orgánicas complejas de matrices acuosas, por su sensibilidad y disponibilidad de detectores, incluyendo el *FID* y el detector selectivo de masas, *MSD*. El tiempo de retención no constituye un parámetro totalmente confiable para el análisis cualitativo, ya que depende de muchas variables experimentales, tales

como tipo de columna, flujo de gas de arrastre, cantidad de muestra inyectada, longitud de la columna cromatográfica insertada dentro del *liner*, entre muchas otras. Para confirmar la estructura molecular de cualquier compuesto, es necesario obtener su espectro de masas [31].

2.2.2 Detectores

El detector de ionización en llama, FID, es comúnmente utilizado en el análisis de productos hidrocarbonados. El FID es sensible al flujo másico, su respuesta es proporcional al número de átomos de carbono (más exactamente, grupos $-CH_2-$) pasados a través de la llama en un tiempo dado. Para análisis cuantitativo, es importante controlar las condiciones del FID para dar una respuesta lineal a los hidrocarburos. La respuesta del FID es producida por la reacción de combustión en una llama formada por hidrógeno y oxígeno. La cantidad mínima de sustancia detectable por el FID es de aproximadamente 10^{-11} - 10^{-12} g (dependiendo del analito), y el rango dinámico lineal del detector se extiende a 10^7 [15, 44, 46].

La ionización en la llama, generada por el hidrógeno y oxígeno, es muy superior a la que se presenta cuando se realiza únicamente ionización térmica; la explicación de este efecto es que los iones no se forman por ionización térmica sino por emisión térmica de pequeñas partículas de carbono, que se forman durante el proceso de combustión. Consecuentemente, el factor dominante en la ionización de material orgánico no es el potencial de ionización sino la función de trabajo de las partículas de carbono que se forman transitoriamente durante la combustión [44].

2.2.3 TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

2.2.3.1 Microextracción en fase sólida en el modo *headspace*

Microextracción en fase sólida, SPME, es una técnica de muestreo, relativamente nueva [33, 34], apta para la extracción y concentración de compuestos orgánicos de diferente polaridad y volatilidad, tanto en matrices orgánicas como inorgánicas. Las principales ventajas de la SPME son: (1) No requiere disolvente; (2) Tiene un bajo costo de operación y, (3) Usa pequeños volúmenes de muestra. Esta última ventaja hace de este método una herramienta prometedora para aplicaciones toxicológicas y biomédicas [2, 20].

Principios de SPME. En SPME, una sustancia polimérica (recubrimiento de la fibra), fijada a un soporte sólido (capilar de sílice fundida), se coloca en contacto con la matriz de la muestra o con su fase vapor (*headspace*, HS), por un período de tiempo determinado. Si este tiempo es considerable, se establece un equilibrio de concentraciones entre la matriz de la muestra, el HS y el recubrimiento de la fibra. Cuando se han alcanzado las condiciones de equilibrio, la exposición de la fibra durante un período de tiempo más largo no acumula una mayor cantidad de analito sobre ésta. La difusión de analitos desde la matriz hasta el recubrimiento de la fibra se inicia en el instante en el que la fibra se pone en contacto con la muestra (Véase **Figura 3**) [33, 34].

Equilibrio multifase. En los recubrimientos en los cuales está involucrado el fenómeno de absorción (por ejemplo, PDMS), el proceso no es competitivo, ni aparecen marcados efectos de desplazamiento. En los recubrimientos en los cuales ocurre un fenómeno de adsorción, el proceso está limitado por la superficie del recubrimiento y se caracteriza por ser un proceso competitivo [33, 34].

Típicamente, se considera que la SPME termina cuando la concentración de analito alcanza el equilibrio de distribución entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. En la práctica, esto significa, que, una vez se alcanza el equilibrio, la cantidad de analito extraído por la fibra es constante dentro de los límites de error experimental y que es independiente de incrementos adicionales en el tiempo de exposición de la fibra [33, 34].

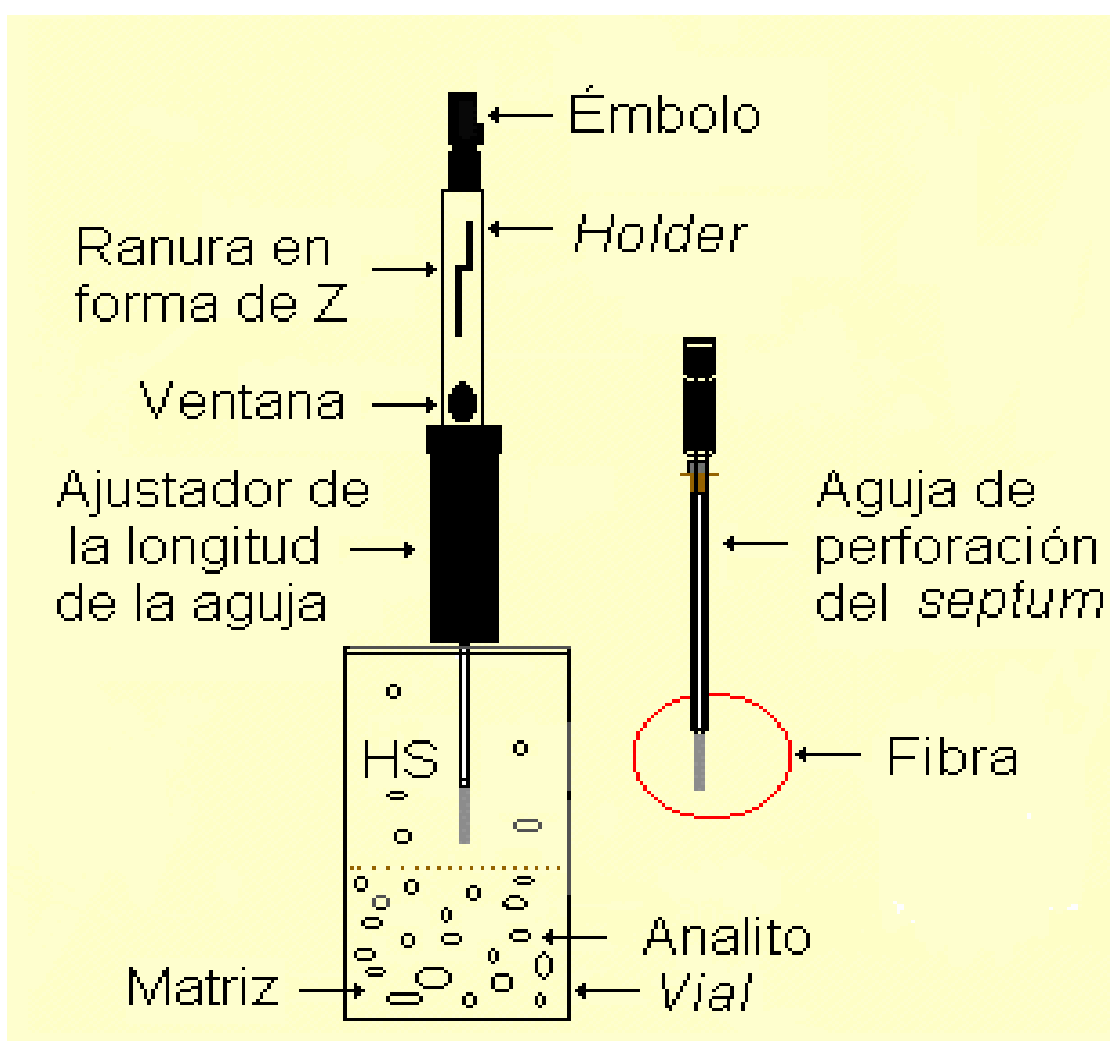


Figura 3. Ilustración esquemática del dispositivo para realizar HS-SPME [14].

Tiempo del muestreo. En el caso de sorbentes sólidos, la extracción ocurre sólo sobre la superficie del recubrimiento de la fibra y, por consiguiente, los compuestos con una afinidad más débil por el recubrimiento sólo se observan cuando se utilizan tiempos de extracción cortos. Sin embargo, en la extracción de analitos utilizando líquidos poliméricos para el recubrimiento de la fibra, ocurre una partición entre la matriz de la muestra y la fase extractante (polímero sobre la fibra). En este caso, la cantidad de analito extraído en el equilibrio varía sólo si las propiedades del recubrimiento de la fibra son modificadas por los compuestos extraídos [33, 34].

Modo de extracción. El muestreo por SPME se puede llevar a cabo en tres modos básicos: (a) Extracción directa o por inmersión; (b) Extracción indirecta o en fase vapor (*headspace*) y, (c) Protección con membrana. En la extracción en modo directo, la fibra es introducida dentro de la muestra y los analitos se difunden desde la matriz hasta la fase extractante. La utilización de mecanismos de agitación es primordial para agilizar la extracción [14, 34].

En la extracción en el modo *headspace*, los analitos son extraídos de la fase gaseosa que se encuentra en equilibrio con la muestra. La razón principal para esta modificación es proteger la fibra de efectos adversos, causados por compuestos de alto peso molecular. Este modo de extracción permite la modificación del pH de la muestra, sin afectar el recubrimiento de la fibra.

En general, los tiempos para alcanzar el equilibrio para compuestos volátiles son más cortos cuando se utiliza el modo *headspace*, que cuando se usa el modo directo, bajo condiciones de agitación similar. Esto se debe a los siguientes factores:

- a). Una cantidad sustancial de analito está presente en el *headspace*, previo al inicio del proceso de extracción;
- b). La existencia de una interfase entre la matriz de la muestra y su *headspace*;
- c). Los coeficientes de difusión en la fase gaseosa son cuatro órdenes de magnitud más altos que en líquidos [33].

Predicción de las constantes de distribución. En muchos casos, las constantes de distribución pueden ser determinadas a partir de datos fisicoquímicos y parámetros cromatográficos. Esta aproximación elimina la necesidad de realizar curvas de calibración. El proceso de partición en SPME, cuando se usa una fibra de PDMS, es similar al proceso de partición en GC y existe una relación bien definida entre la constante de distribución y el tiempo de retención.

Efectos de los parámetros de extracción. La teoría termodinámica predice cómo modificar los efectos de ciertas condiciones de extracción sobre la partición e indica los parámetros a controlar para obtener una reproducibilidad alta. Esta teoría puede aplicarse para optimizar las condiciones de extracción con un menor número de experimentos. Las condiciones de extracción que afectan la constante de distribución (K_{fs}) son la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la cantidad de disolvente orgánico contenido en el agua.

Una temperatura de extracción elevada causa un incremento en la velocidad de extracción y, simultáneamente, un decrecimiento en la constante de distribución. El ajuste del pH de la muestra puede mejorar la sensibilidad del método para analitos ácidos y básicos. El volumen de la muestra debe ser seleccionado con base en la K_{fs} estimada [14, 33, 34].

2.2.3.2 Extracción líquido-líquido. La extracción líquido-líquido es una técnica útil en el análisis de matrices acuosas de carácter ambiental. Su principio consiste

en la distribución o reparto de un analito entre la matriz y un disolvente de extracción, generalmente, orgánico y de baja polaridad como hexano, cloroformo o diclorometano. Este reparto está representado por un equilibrio entre C_O y C_{Aqu} , donde C_O es la concentración del analito en la fase orgánica y C_{Aqu} es la concentración del mismo en la fase acuosa. El coeficiente entre estos dos términos se llama el coeficiente de partición (K), **(Ecuación 1)** [14]:

$$K = C_O / C_{Aqu} \quad (1)$$

El coeficiente de partición depende del tipo de disolvente orgánico, de la temperatura, del pH del medio acuoso y de la cantidad de materia orgánica, razón por la cual es necesario establecer los valores más adecuados de estos parámetros en la aplicación de dicha técnica, para así obtener porcentajes de recuperación y reproducibilidad altos.

Los principales criterios para la selección del disolvente son [14]:

- a). Miscibilidad con el agua (para matrices acuosas);
- b). Polaridad muy similar a la del analito,
- c). Volatilidad alta;
- d). Compatibilidad con las siguientes etapas de análisis;
- e). Baja toxicidad.

2.2.3.3 Headspace estático. El muestreo *headspace* es un método indirecto para la determinación de analitos volátiles de una muestra sólida o líquida en la cual la fase vapor es analizada. Si los analitos en la fase vapor han alcanzado el equilibrio con los presentes en la muestra, entonces la técnica de muestreo es *headspace* estático (S-HS); si la fase vapor se purga con un gas inerte y

subsecuentemente es absorbida en un disolvente o un material ab(d)sorbente sólido, la técnica de muestreo es *headspace* dinámico [3].

Existen varios métodos para S-HS, pero el más utilizado es el sistema automático de inyección con *loop* presurizado. Este sistema emplea una válvula de seis puertos o conductos, que pueden adaptarse para tres diferentes funciones, a saber: presurización, venteo y muestreo.

Inicialmente, la muestra se mantiene cierto tiempo dentro de un termostato, que es el horno de incubación, a una temperatura dada hasta que se alcance el equilibrio entre la fase vapor y la muestra. Para la etapa de presurización, se adapta una válvula y el *vial* se eleva, permitiendo así que el *septum* del *vial* sea perforado por una aguja, y sea posible la entrada del gas auxiliar [14, 18].

Para la etapa de llenado del *loop*, la válvula se adapta para el venteo y la fase vapor, contenida en el *vial*, llena el *loop* durante el tiempo determinado hasta que se alcanza el equilibrio. El *loop* se llena por diferencia de presión. Por último, para la transferencia de la muestra al GC desde el *loop*, la válvula se adapta para el muestreo, lo cual le permite al gas de arrastre llevarse la muestra contenida en el *loop*, hasta la columna cromatográfica por medio de una línea de transferencia [18].

2.2.4 Hidrocarburos alifáticos y BTEX's

2.2.4.1 Hidrocarburos alifáticos

Toxicidad. Los efectos de la exposición aguda a estos compuestos son: anestesia, mareos, cefalea, náuseas, vómitos, somnolencia, fatiga, “embriaguez”, depresión, irritación del aparato respiratorio y pérdida del conocimiento. Dentro de

los efectos por una exposición crónica se encuentran dermatitis, cefalea, pérdida de la memoria a corto plazo y dificultad en la concentración [5-7, 37, 39].

Metabolismo y excreción. Los alcanos son absorbidos por inhalación y a través de la piel. Los hidrocarburos no ramificados, como *n*-hexano y *n*-heptano, son metabolizados a alcoholes por las enzimas microsómicas tipo Citocromo P-450 a alcoholes, cetonas y dicetonas, que son conjugadas con ácido glucurónico y eliminados por la orina [37].

Monitoreo de la exposición. Para trabajadores expuestos a una concentración de *n*-hexano en el aire de 69 mg/m³ durante 4 horas, se encuentra, en promedio, una concentración de *n*-hexano en la orina de 6 ppb [39]. En la **Tabla 1** [39], aparecen las concentraciones de los principales metabolitos de *n*-hexano en orina, después de una exposición a este hidrocarburo, en concentración de 182 mg/m³ en el ambiente, durante un día de trabajo normal.

TABLA 1. Concentración de metabolitos de *n*-hexano en la orina de trabajadores expuestos a este hidrocarburo en el aire (182 mg/m³).

Metabolito	Concentración, mg/L
2,5-Hexanodiona	5,4
2,5-Dimetilfurano	3,7
γ -Valerolactona	3,3
2-Hexanol	0,2

Prieto y colaboradores [38] reportaron concentraciones de *n*-hexano, *n*-heptano y tolueno de 113, 24 y 80 mg/m³, respectivamente, en el aire al interior de una fábrica de calzado de España. El muestreo de aire se hizo utilizando cartuchos con carbón activado y bombas Sipin de flujo continuo (0.2 L/min), los cartuchos estaban adheridos a las prendas de los trabajadores de la fábrica y se cambiaban

cada 50 min durante el período de muestreo, para evitar saturación. Los disolventes atrapados en el cartucho fueron desorbidos con disulfuro de carbono y, luego, analizados por GC-FID.

2.2.4.2 Benceno

Efectos hematopoyéticos, leucemógenos y clastógenos. En la exposición aguda a benceno en cantidad grande (> 30 ppm), por ingestión o por inhalación de sus vapores, el principal efecto tóxico se ejerce sobre el sistema nervioso central (SNC). Los síntomas de una exposición leve incluyen mareos, debilidad, euforia, cefalea, náuseas, vómitos, pérdida de apetito y descoordinación en la marcha. Si la exposición es más severa, los síntomas progresan a visión borrosa, temblores, irregularidades ventriculares, parálisis e inconciencia [6, 7, 26].

Los efectos sistémicos agudos en humanos, por inhalación o ingestión de benceno o tolueno son: sensación de quemado en la boca y en el estómago, ataxia, confusión, torpeza, histeria, estupor, discracia sanguínea severa y coma intermitente, entre otros [26].

El benceno es un irritante de la piel, los ojos y el tracto respiratorio superior, produce eritema (por eliminación de grasa que recubre la piel) y dermatitis o vesiculación y edema [6, 26].

Aunque la exposición aguda a benceno en concentraciones altas puede deprimir el SNC, lo que da pie a pérdida del conocimiento y muerte; el principal efecto tóxico del benceno es la toxicidad hematopoyética: un efecto singular para el benceno entre los hidrocarburos aromáticos simples. La exposición crónica al benceno en seres humanos, en el lugar de trabajo, conduce a daño de la médula ósea, que puede manifestarse como anemia, leucopenia, trombocitopenia, colapso respiratorio y fibrilación ventricular [7].

El grado al cual cada uno de los tipos de células se agota, varía con el individuo y con la magnitud de la exposición al benceno. La exposición continua a este compuesto puede culminar en pancitopenia, originada por aplasia de la médula ósea, un resultado a menudo letal. Los sobrevivientes de anemia aplásica suelen mostrar un estado preleucémico denominado mielodisplasia y progresar a leucemia mielógena aguda [7]. Los valores máximos permitidos para los BTEX's en el aire se reportan en la **Tabla 2** [27].

TABLA 2. Umbrales establecidos para los BTEX's en el aire de una industria o en el aire ambiental [5, 39].

Compuesto	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	Xilenos
Concentración, ppm	10	50	100	100
Concentración, mg/m ³	32	188	434	434

Metabolismo y excrección. El benceno se convierte al óxido de benceno, mediante la enzima oxidasa de función mixta microsómica hepática. Este óxido, que se encuentra en equilibrio con su forma oxepina, puede reordenarse de modo no enzimático, para formar un fenol; reaccionar con glutatión para formar ácido premercaptúrico, que después se convierte al ácido fenilmercaptúrico, o reaccionar con la enzima epóxido hidrolasa, que convierte el óxido en 1,2-dihidrodiol y 1,4-dihidrodiol bencenos, (Véase **Figura 4**) [5, 7].

La enzima dihidrodiol deshidrogenasa citosólica parece ser la que se encarga de la rearomatización del anillo para producir catecol o hidroquinona [5, 7].

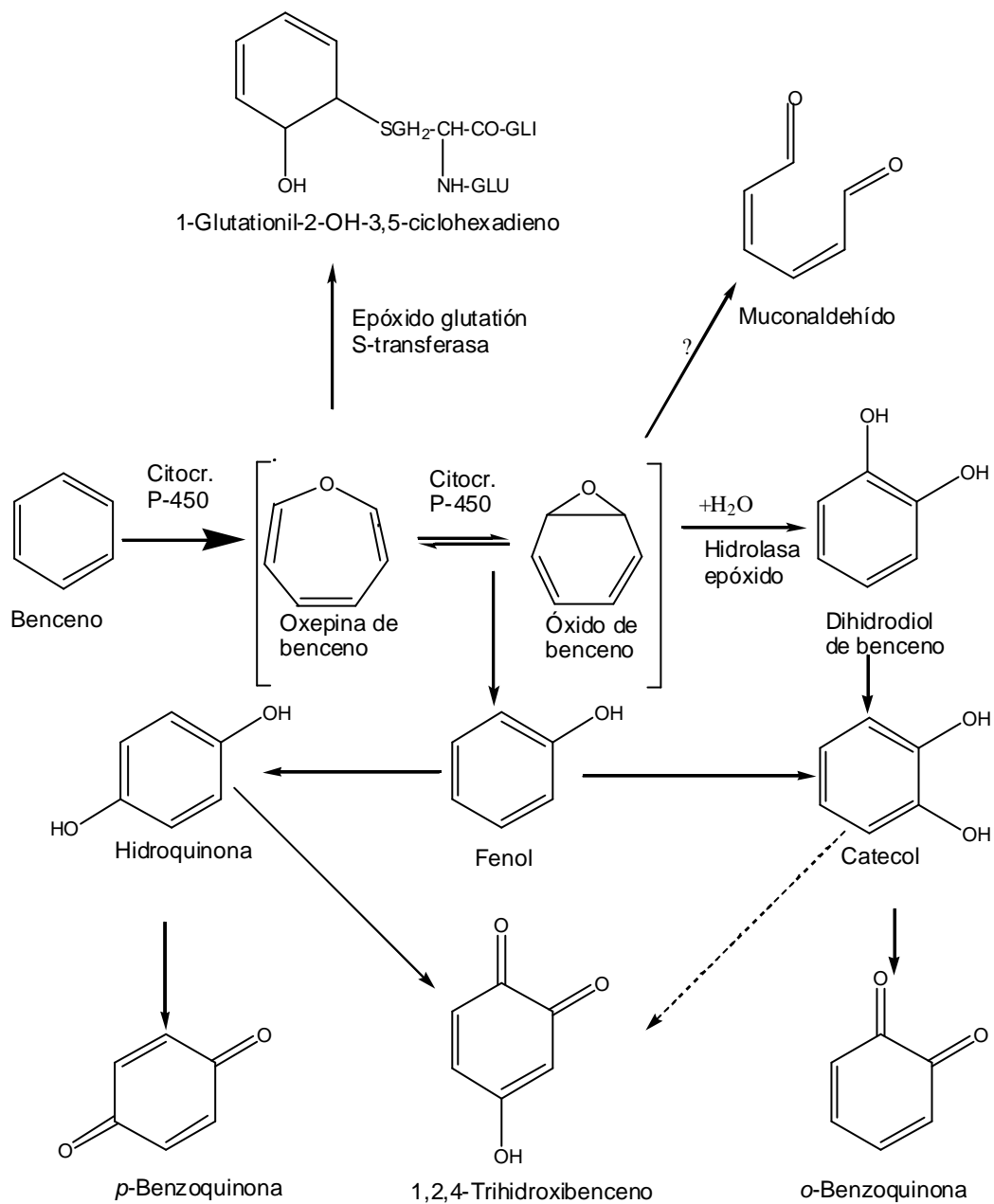


Figura 4. Biotransformación del benceno [3,39].

Inmediatamente después de la exposición de una persona al benceno, sólo el 12% de la dosis es exhalada, sin metabolizar, por los pulmones y alrededor del 0.1% se excreta por la orina. El benceno remanente es metabolizado en el hígado, a productos de oxidación altamente tóxicos. La cinética de eliminación del benceno,

dentro del cuerpo humano, se describe por un modelo abierto de dos componentes con tiempos de vida media de 1 a 3 horas y 9 a 24 horas [5, 39].

Durante las 48 horas posteriores a la exposición al benceno, del 51 al 87% de una dosis de este hidrocarburo es metabolizado y excretado en la orina como fenol, 6% como catecol y 2% como hidroquinona. Otros metabolitos minoritarios del benceno son 1,2,4-trihidroxibenceno, ácidos mucónico y fenilmercaptúrico [39].

Monitoreo de la exposición al benceno. La exposición ocupacional al benceno se monitorea algunas veces mediante la determinación de fenoles, ácido mucónico, benceno y ácido fenilmercaptúrico, en la orina. Otro índice de exposición al benceno es la relación de sulfatos orgánicos/inorgánicos en la orina [39].

2.2.4.3 Tolueno

Toxicidad. El tolueno es un depresor del SNC y a bajas concentraciones produce fatiga, debilidad y confusión. Por sus efectos sobre el SNC los husmeadores de pegamentos inhalan vapores del Bóxer. A diferencia del benceno, el tolueno no produce anemia aplásica ni leucemia [5, 7, 23, 39].

El tolueno en concentraciones muy altas, que se presentan en personas que inhalan los vapores de los pegamentos, origina ataxia cerebelosa, persistente después de la exposición, así como cambios en las funciones integradoras del SNC y acidosis tubular renal de tipo distal [7].

Personas expuestas a tolueno en una concentración de 500 ppm, pueden presentar dolor de cabeza, náuseas, languidez y empeoramiento en la coordinación, sin efectos fisiológicos detectables. A concentraciones

considerablemente más altas, el tolueno tiene un efecto narcótico que puede conducir a un estado de coma o la muerte [26, 39] (Véase, **Tabla 3**).

TABLA 3. Concentraciones de tolueno en tejidos o fluidos biológicos, en 8 especímenes humanos *postmortem* (mg/L o mg/kg) [39].

	Sangre	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñones	Orina
Promedio	22	47	12	43	21	3
(Rango)	(10-48)	(10-182)	(3-135)	(13-73)	(11-39)	(1-5)

Hasta la fecha (enero de 2005), no se ha reportado sobre las aberraciones cromosómicas en seres humanos expuestos a tolueno.

La exposición crónica al tolueno de animales produce pérdida progresiva e irreversible de la audición de alta frecuencia [6, 7].

Metabolismo y excreción. Aproximadamente 80% de una dosis absorbida de tolueno se oxida a ácido benzoico, el cual después se conjuga con ácido glucurónico o glicina y se excreta por la orina (Véase, **Figura 5**). El conjugado con glicina (ácido hipúrico), excretado por la orina en las siguientes 24 horas después de terminada la exposición, da cuenta de aproximadamente el 68% de una dosis de tolueno inhalado y tiene un tiempo de vida media de excreción de 2 a 3 horas. Más del 20% de la dosis inhalada se elimina sin metabolizar y menos del 0.1% se excreta en la orina [39].

El tolueno es oxidado, en un menor grado, a *o*-, *m*-, y *p*-cresoles, los cuales son probablemente excretados en la orina en forma conjugada [39].

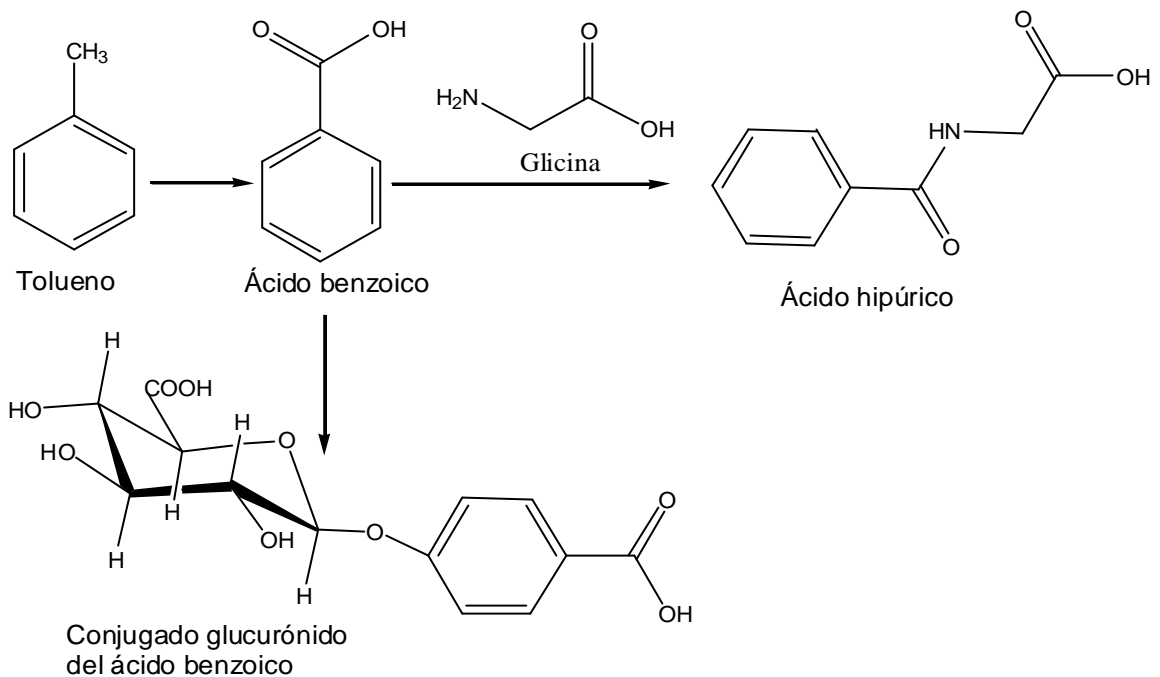


Figura 5. Biotransformación del tolueno [39].

Monitoreo de la exposición al tolueno. El tolueno en el aire alveolar alcanza una concentración máxima en los primeros 15 a 30 minutos, después de iniciada la exposición, y decae rápidamente después de terminada la exposición. Al comparar la concentración de tolueno en sangre con respecto a la determinada en orina, se encuentra, que el cociente de estas concentraciones está en un rango de 7 a 15, respectivamente. Para trabajadores expuestos a una concentración de tolueno en el aire de 100 ppm durante 4 horas, se encuentra, en promedio, una concentración 220 ppb de tolueno en la orina [39].

2.2.4.4 Etilbenceno

Toxicidad. La exposición a etilbenceno en una concentración de 1000 ppm en el aire, causa irritación de los ojos y la nariz. Concentraciones de 2000 ppm o superiores pueden causar lacrimación, mareo y depresión del SNC [26, 39].

Metabolismo y excreción. El etilbenceno se metaboliza, dentro del cuerpo humano, por oxidación de la cadena alifática a metilfenilcarbinol. La oxidación de este primer metabolito produce ácidos mandélico y fenilgloxílico (Véase, **Figura 6**), los cuales representan el 64 y el 25%, respectivamente, de una dosis de etilbenceno inhalada y posteriormente excretada por la orina. Sólo una mínima parte de la dosis se elimina sin metabolizar, a través del aire expirado y en la orina [39].

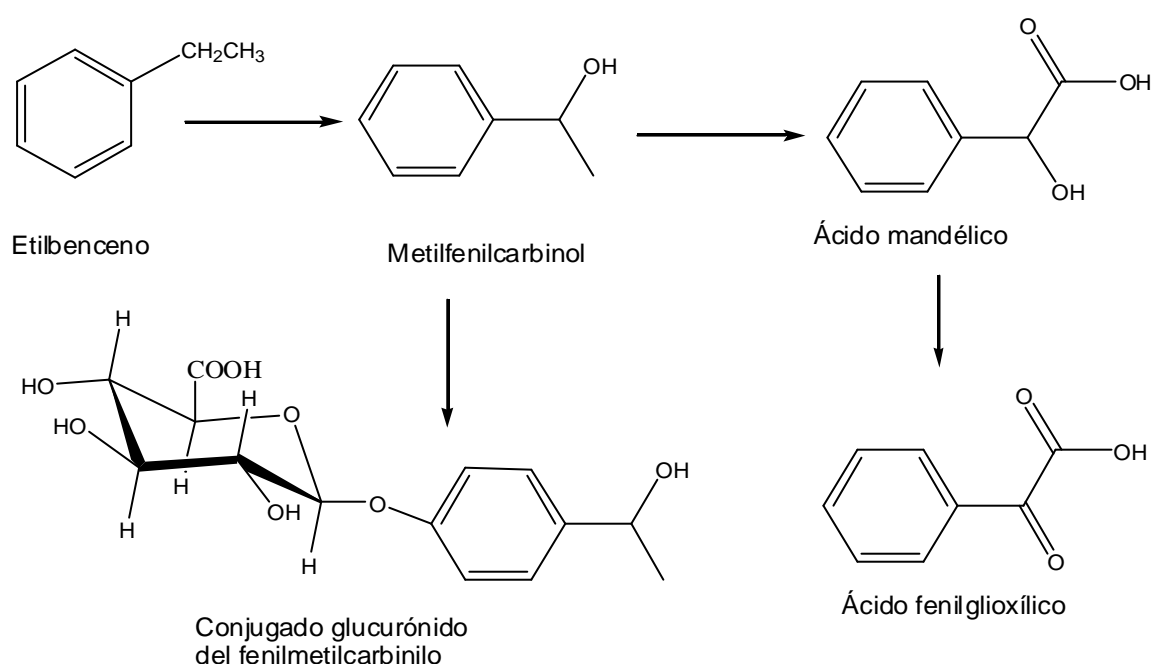


Figura 6. Biotransformación del etilbenceno [5, 39].

La excreción urinaria del ácido mandélico alcanza un máximo durante las últimas 2 horas de una exposición de 8 horas, y luego decae con un tiempo de vida media de 4 a 7 horas, después de terminada la exposición. La concentración del ácido mandélico, determinada en la orina de trabajadores previamente expuestos a etilbenceno en una concentración de 92 ppm en el ambiente, durante ocho horas, fue de 900 ppm [39].

2.2.4.5 Xilenos

Toxicidad. La exposición a xilenos en una concentraciones de 200 ppm en el aire, produce irritación de la membrana mucosa, náuseas, vómito, mareo y descoordinación. La exposición a xilenos en una concentración de 10.000 ppm en el aire conduce a la pérdida de conciencia en trabajadores, debido a la depresión del SNC, y algunas veces, a la muerte [25, 39].

Metabolismo y excreción. Los tres isómeros del xileno (*o*-, *m*-, *p*-) se metabolizan rápidamente dentro del organismo humano, principalmente, por la oxidación de un grupo metilo a los correspondientes ácidos *o*-, *m*-, y *p*-toluicos; alrededor de un 72% de una dosis absorbida se elimina en la orina de las siguientes 18 horas después de terminada la exposición, en forma conjugada con glicina (Véase, **Figura 7**). Aproximadamente, el 2% de una dosis de xilenos, inhalados o ingeridos, se excreta en la orina en forma de xilenol, probablemente, en forma conjugada. Sólo el 5% de la dosis se depura sin metabolizar en el aire exhalado y menos del 0.1% en la orina.

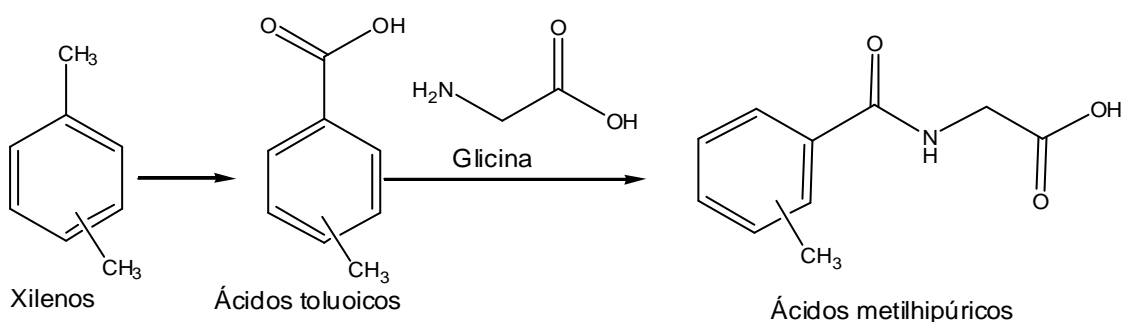


Figura 7. Biotransformación de los xilenos [39].

La velocidad de excreción y la cantidad de los principales metabolitos de los xilenos se usan como índices de su grado de exposición. A diferencia del ácido hipúrico, el ácido metilhipúrico no es un compuesto habitual en la orina [5, 7, 39].

De la revisión bibliográfica realizada, se puede concluir que para los BTEX's e hidrocarburos alifáticos se conocen los valores máximos permitidos en aire [27], la ruta de absorción, metabolización y eliminación [5-7,12, 23, 37, 39], los efectos que ejercen sobre su metabolismo el alcohol, hábitos de fumar y la edad [22, 48], y los efectos tóxicos que producen sobre el organismo humano, dependiendo de su concentración en el aire [5-7, 13, 23, 26,37, 39, 49]. Se han hecho varios estudios para la cuantificación de estos compuestos en aire, agua, sangre y orina [9, 16, 17, 19, 21, 24, 28-30, 38, 40-42, 45, 47]. La mediciones se han realizado, principalmente, en el aire de áreas urbanas y en el interior de algunas fábricas de pinturas y calzado, en muestras de orina y sangre de trabajadores expuestos a los vapores de disolventes, pegamentos o personas con hábitos de fumar [22, 30, 38, 40, 48]. La mayoría de las determinaciones en sangre y orina se realizan a los metabolitos de los compuestos mencionados y, generalmente, en forma individual [4, 17, 19, 22, 32, 39, 48].

Para la determinación de estos compuestos, se han utilizado diferentes técnicas de extracción, *i.e.* absorción en cartuchos de carbón activado o Porapak Q, purga y trampa, S-HS, SPME, HS-SPME, SPE y LLE y análisis por HPLC, GC-FID y GC-MS. No se encontraron reportes sobre el análisis de BTEX's en forma simultánea con hidrocarburos alifáticos en muestras de orina, y para el caso de Colombia no se han reportado determinaciones de hidrocarburos en muestras de orina; esta situación originó la necesidad de realizar este proyecto como mecanismo de control de las condiciones de higiene industrial de los trabajadores de las fábricas de calzado de nuestro país, y en particular, en Bucaramanga.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REALIZACIÓN DE LA ENCUESTA A LOS TRABAJADORES QUE LABORAN EN LA MANUFACTURA DEL CALZADO.

Con base en el análisis de la literatura sobre los factores que afectan el metabolismo de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos en el organismo humano, se realizó una encuesta (Véase **Anexo 1**) a los 12 trabajadores, que laboran en la manufactura del calzado, y que suministraron las muestras de orina, acerca de las condiciones de higiene industrial y su salud.

La fábrica seleccionada para este estudio se especializa en la producción de calzado deportivo y elegante para caballero, con destino, principalmente, hacia Venezuela y Ecuador. El número de trabajadores al interior de la fábrica era 50, tanto hombres como mujeres. El interior de la fábrica estaba dividido en las secciones de diseño, montaje, corte, guarnición y pegado, emplantillado y terminado. En un día normal, los trabajadores estaban expuestos a un ambiente de aproximadamente 30 °C, como consecuencia del alto hacinamiento, el abundante número de bombillas para la iluminación y los mecheros utilizados. Por otra parte, la posición corporal para trabajar tenía muchas fallas ergonómicas; los trabajadores soportaban el ruido del martilleo durante toda su jornada laboral (7:00 a.m. a 7:00 p.m.).

3.2 ANÁLISIS DEL PEGANTE “PC-2000” POR HS-SPME/HRGC-MSD.

Para la extracción y concentración de los compuestos de la fase vapor del pegante “PC-2000”, una fibra de sílice fundida recubierta con PDMS de 100 µm de espesor

(Supelco, Catálogo N° 57310-U; Bellefonte, PA, EE.UU.), se expuso al pegante durante 15 min a 25 °C. Seguidamente, se realizó la desorción de los compuestos absorbidos sobre la fibra, en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS), durante 10 min a 250 °C. Se utilizó una columna capilar DB-1MS, [poli(dimetilsiloxano)], 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e.). La temperatura del horno se programó desde 35 °C (3 min) hasta 150 °C (5 min) con una rampa de calentamiento de 5 °C/min. Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: el inyector se operó a 250 °C con un *split* 1 : 30, la presión de helio a la entrada de la columna fue de 200 kPa, con una velocidad de flujo de 1 mL/min (70 °C). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 230 y 285 °C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue de 69.9 eV. El analizador másico cuadrupolar se operó en el modo *full scan* (barrido completo).

Para la identificación inequívoca se utilizó el sistema de datos *Enhanced ChemStation* G1701 DA (Versión D.00.01.27), equipado con bibliotecas de espectros de masas, NBS75K y Wiley 138 de 75000 y 138000 espectros de masas, respectivamente.

3.3 SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO GC-FID.

El análisis de los extractos de orina se realizó utilizando un cromatógrafo de gases HP5890 *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU), equipado con inyector *split/splitless*; en modo de inyección manual (SPME) e inyección automática (S-HS), detector de ionización en llama y sistema de datos HP *ChemStation* Rev. A. 05. 01. La columna capilar empleada fue HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) y 0.52 µm de espesor de la fase estacionaria (f.e.), Modelo N° HP19091J-431. El gas de arrastre utilizado fue helio (99.995%, Aga Fano S. A., Bucaramanga, Colombia) con presión de entrada de 200 kPa y una velocidad volumétrica de 1.6 mL/min. Los flujos de aire,

hidrógeno y nitrógeno (gas *make-up*) en el detector fueron 360, 31 y 21 mL/min, respectivamente. Se utilizó una relación de *split* de 10 :1.

Para seleccionar la programación de temperatura del sistema HRGC/ FID, se realizaron varias ramplas de calentamiento en el horno del cromatógrafo de gases, con la cual se obtuvo una separación cromatográfica eficiente de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos de interés, descritos en la **Tabla 4**. Para estas pruebas se preparó una solución metanólica de 10 ppm de cada uno de los hidrocarburos de interés y el patrón interno (clorobenceno).

En la **Tabla 5**, se presentan las temperaturas empleadas para el análisis cromatográfico (GC-FID) de las muestras de orina, obtenidas por las técnicas HS-SPME y S-HS.

TABLA 4. BTEX's e hidrocarburos alifáticos de interés utilizados para la selección de la programación de temperatura del horno del cromatógrafo.

COMPUESTO	ESPECIFICACIONES
<i>n</i> -Hexano	= 98.5%; <i>Merck KGaA</i> ; Darmstadt, Alemania.
<i>n</i> -Heptano	99.5%; <i>J. T. Baker</i> ; Phillipsburg, NJ, EE.UU.
Ciclohexeno	99.5%; <i>Aldrich Chemical Company, Inc.</i> Milwaukee, EE.UU.
<i>n</i> -Hexadecano	99.5%; <i>Merck KGaA</i> ; Darmstadt, Alemania.
Benceno	99.9%; <i>J. T. Baker</i> ; Phillipsburg, NJ, EE.UU.
Etilbenceno	99.5%; <i>Merck KGaA</i> ; Darmstadt, Alemania.
Tolueno	= 99.9%; <i>Merck KGaA</i> ; Darmstadt, Alemania.
<i>m</i> -Xileno	> 99%; <i>Merck KGaA</i> ; Darmstadt, Alemania.
<i>p</i> -Xileno	> 99%; <i>Merck Schuchardt OHG</i> ; Hohenbrunn, Alemania.
<i>o</i> -Xileno	> 99%; <i>Merck Schuchardt OHG</i> ; Hohenbrunn, Alemania.
Clorobenceno (Istd)	= 99.9%; <i>Merck KGaA</i> ; Darmstadt, Alemania.

TABLA 5. Temperaturas empleadas para el análisis cromatográfico de los patrones y extractos de orina, obtenidas por las técnicas HS-SPME y S-HS.

PARAMETROS	
Temperatura del inyector	250 °C (<i>Split</i> 1 : 10)
Temperatura del FID	270°C
Programación de temperatura de la columna	35 °C (5 min)@ 4 °C/min hasta 100 °C (5 min)@ 10 °C/min hasta 250 °C (8.7 min)

3.4 DETERMINACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN ABSOLUTOS Y RELATIVOS, ÁREAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS.

A partir de reactivos grado analítico (Véase, **Tabla 4**) se preparó una solución “stock” (Véase **Tabla 6**) en metanol (99.9%; *J. T. Baker*, Phillipsburg, NJ, EE.UU) y, luego, se realizaron diluciones para enriquecer las muestras de orina, cuya concentración estuviera en el rango de concentraciones de 5 a 521 ppb. Las concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, utilizadas en la técnica HS-SPME/HRGC/FID, se presentan en la **Tabla 7**; las condiciones experimentales aparecen en el **Numeral 3.5**. Las concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, utilizadas en la técnica S-HS/HRGC/FID, se presentan en la **Tabla 8**; las condiciones experimentales aparecen en el **Numeral 3.6**. A cada uno de los *viales*, que contenían muestras de orina, se les adicionó clorobenceno, como estándar interno (Istd), cuya concentración final fue 33 µg/L.

TABLA 6. Solución stock de hidrocarburos disueltos en metanol.

Hidrocarburo	Concentración, mg/L	Hidrocarburo	Concentración, mg/L
<i>n</i> -Hexano	990	Tolueno	1039
<i>n</i> -Heptano	1026	<i>m</i> -Xileno	1042
Ciclohexeno	1215	<i>o</i> -Xileno	968
Benceno	967	<i>p</i> -Xileno	1033
Etilbenceno	1039		

TABLA 7. Concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, utilizadas en la técnica HS-SPME/HRGC/FID.

Hidrocarburo	Concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, $\mu\text{g/L}$						
	5	10	25	50	74	99	297
<i>n</i> -Hexano	5	10	25	50	74	99	297
<i>n</i> -Heptano	5	10	26	51	77	103	307
Ciclohexeno	6	12	30	61	91	121	364
Benceno	5	10	24	48	72	97	290
Etilbenceno	5	10	26	52	78	104	312
Tolueno	5	10	26	52	78	104	312
<i>m</i> -Xileno	5	10	26	52	78	104	312
<i>o</i> -Xileno	5	10	24	48	73	97	290
<i>p</i> -Xileno	5	9	24	47	71	98	284

Teniendo en cuenta la concentración de los hidrocarburos en las muestras de orina, se determinaron los tiempos de retención, t_R , tiempos de retención relativos,

t_{RR} , áreas absolutas, A_i^* y áreas relativas, A_i^*/A_{Istd} y, se evaluaron los siguientes parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar (s) y coeficientes de variación (%), para cada uno de los analitos de la **Tabla 4**.

3.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN HS-SPME.

3.5.1 Descripción de las condiciones experimentales de la técnica

La estandarización de los parámetros de extracción se llevó a cabo utilizando reactivos grado analítico (*Aldrich, Merck y J.T. Baker*) de cada uno de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos de interés.

TABLA 8. Concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, utilizadas en la técnica S-HS/HRGC/FID.

Hydrocarburo	Concentraciones de los hidrocarburos en las muestras de orina, $\mu\text{g/L}$						
<i>n</i> -Hexano	7	10	16	33	50	330	495
<i>n</i> -Heptano	7	10	17	34	51	257	513
Ciclohexeno	9	12	20	40	61	202	405
Benceno	7	10	16	32	48	322	483
Etilbenceno	7	10	17	35	52	260	512
Tolueno	7	10	17	36	52	260	520
<i>m</i> -Xileno	7	10	17	35	52	261	521
<i>o</i> -Xileno	7	10	16	32	48	242	484
<i>p</i> -Xileno	7	10	17	35	52	260	512

El *n*-tetradecano se agregó para estudiar el comportamiento de los compuestos de alto peso molecular presentes en la orina y que, eventualmente, pudieran pasar a la fase vapor. Los parámetros de extracción se seleccionaron con base en la naturaleza química de los analitos (polaridad, punto de ebullición, peso molecular, entre otras) y teniendo en cuenta las condiciones experimentales utilizadas en trabajos anteriores [8-10, 22, 35, 36, 41-43].

En un *vial* color ámbar de 4 mL para SPME (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.) se vertieron 2 mL de orina con una pipeta volumétrica de 2 ± 0.01 mL (*Brand*; Wertheim, Alemania), luego, se adicionaron 0, 200, 400 ó 600 mg de NaCl (> 99.8%; *Carlo Erba Reagenti*; Rodano, Italia), dependiendo del % de sal requerido; posteriormente, se adicionaron 20 μ L de la solución *stock*, con una jeringa tipo Hamilton de 10 ± 0.1 μ L (*Supelco*, Catálogo N° 20734, Bellefonte, PA, EE.UU.). Inmediatamente se introdujo el magneto de agitación (*Brand*, ref. 137108; Wertheim, Alemania) y se colocó la tapa del *vial* junto con un *septum* de silicona blanca (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.). En la **Tabla 9**, se presentan las especificaciones de algunos de los materiales empleados en los **Numerales 3.5 y 3.6**.

En un vaso de precipitados de 50 mL (*Schott Duran*, Mainz, Alemania), lleno con agua destilada, el *vial* sellado se sumergió parcialmente, utilizando unas pinzas de tres ramas con nuez de sujeción (*Brand*, Wertheim, Alemania). El vaso de precipitado estaba sobre una manta de calentamiento y agitación (*Schott*, modelo MR 1065; Mainz, Alemania).

A la fase vapor de la muestra de orina en el *vial*, se expuso una fibra de sílice fundida recubierta con PDMS de 100 μ m de espesor (*Supelco*, catálogo N° 57310-U; Bellefonte, PA, EE.UU.), durante 15 min a 22 °C, para la extracción de los hidrocarburos. Seguidamente, se realizó la desorción de los compuestos

TABLA 9. Especificaciones del material de laboratorio descrito en el Numeral 3.5

Material de laboratorio:	ESPECIFICACIONES
<i>Septa</i>	<p><i>Septa</i> de silicona blanca recubiertas con teflón blanco para <i>viales</i> de 15 mm x 45 mm; Ref. 5183-4464; <i>Agilent Technologies</i>, Palo Alto, CA, EE.UU.</p> <p><i>Septa</i> moldeadas de PTFE gris/ butilo negro, 20 mm, Ref. 9301-0976; <i>Agilent Technologies</i>, Palo Alto, CA, EE.UU.</p>
<i>Viales</i>	<p><i>Viales</i> de rosca, color ámbar, para SPME de 4 mL, 15 x 45 mm. Ref. 5183-4450; <i>Agilent Technologies</i>, Palo Alto, CA, EE.UU.</p> <p><i>Viales</i> de fondo plano para espacio de cabeza, 20 mL, 23 x 75 mm. Ref. 5182-0837; <i>Agilent Technologies</i>, Palo Alto, CA, EE.UU.</p>
Dispositivo para SPME	Dispositivo para muestreo manual por SPME; <i>Supelco</i> , Catálogo N° 57330-U; Bellefonte, PA, EE:UU.
Gases especiales para GC	He, N ₂ , aire, H ₂ , pureza: 99.995%; AGA Fano S.A., Bucaramanga, Colombia.
Pinzas de tres ramas con nuez de sujeción	Pinzas de tres ramas con nuez de sujeción, con dos brazos de sujeción de ajuste independiente para posicionado exacto del vial; <i>Brand</i> , Wertheim, Alemania.
Balones aforados	2, 5 y 10 mL; <i>Kimax</i> ; New Hyde Park, N. J., EE:UU.
Balanza analítica	Modelo AG285, exactitud $\pm 0.01/0.1$, <i>Mettler Toledo</i> , Schwerzenbach, Suiza.
Encapsulador	Encapsulador manual de 20 mm, Ref. 9301-0720; <i>Agilent Technologies</i> , Palo Alto, CA, EE.UU.

absorbidos sobre la fibra, en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, durante 10 min a 250 °C.

Todas las muestras de orina utilizadas para el estudio de los diferentes parámetros (agitación, temperatura, tiempo de exposición, pH y adición de sal) fueron suministrados por el autor, cada dos días se renovaba la orina y se le realizaba su respectivo blanco. No se le adicionaba ningún tipo de preservante. Todos los análisis de las muestras de orina enriquecidas se realizaron por triplicado.

3.5.2 Estudio del efecto de agitación sobre la eficiencia de la extracción

Para la determinación del efecto que tenía la agitación sobre la eficiencia de extracción de los compuestos ya mencionados en las muestras de orina enriquecidas, se probaron 2 formas, a saber: sin agitación y con agitación a 500 rpm, utilizando un magneto de forma cilíndrica (*Brand*, ref. 137108; Wertheim, Alemania), completamente encapsulado en poli(tetrafluoroetileno), PTFE, de 10 mm de largo y 3 mm de diámetro exterior.

Para todo los experimentos se utilizó la manta de agitación-calentamiento descrita en el **Numeral 3.5.1** y el mismo magneto. El magneto se lavó con abundante agua y jabón, proceso asistido por radiación ultrasónica; luego, se introdujo dentro de un microtubo cónico (*Brand*, ref. 780500; Wertheim, Alemania) junto con 1 mL de metanol y se agitó vigorosamente durante 5 min; posteriormente, se secó y se sometió a calentamiento a 50 °C en una estufa durante 10 min.

3.5.3 Estudio del efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de la extracción

Para la determinación del tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de extracción se utilizaron tiempos de 2, 5, 10, 15 y 30 min a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y con agitación a 500 rpm.

3.5.4 Estudio del efecto del pH y *salting-out* sobre la eficiencia de la extracción

Se determinó el efecto del pH y de la adición de sal (*salting-out*) sobre la eficiencia de extracción de los componentes volátiles de las muestras de orina, enriquecidas con BTEX's e hidrocarburos alifáticos, de acuerdo con la metodología que se resume a continuación: para estudiar el efecto de cambio de pH sobre la eficiencia de la extracción de los analitos, descritos en la **Tabla 4**, se utilizaron soluciones de ácido sulfúrico, H_2SO_4 , (99.7%. *J. T. Baker*, Phillipsburg, N.J., EE.UU.), 0.5 M, e hidróxido de sodio, NaOH, ($\approx 99\%$. *Carlo Erba Reagenti*; Rodano, Italia), 0.5 M, para obtener muestras de orina a pH 2 y 12, respectivamente. Para evaluar el efecto *salting-out*, se adicionó NaCl ($> 99.8\%$; Carlo Erba Reagenti; Rodano, Italia) a las muestras de orina enriquecidas hasta lograr concentraciones de 10, 20 y 30 % p/v.

3.5.5 Estudio del efecto de la temperatura del *vial* sobre la eficiencia de extracción

Para determinar el efecto de la temperatura de calentamiento del *vial* sobre la extracción de los analitos en muestras de orina enriquecidas, se llevaron a cabo pruebas a 22, 40 y 60 $^{\circ}\text{C}$, con un tiempo fijo de exposición de la fibra de 15 min. Para este procedimiento, se utilizó el mismo sistema de agitación y calentamiento, descrito en el **Numeral 3.5.2**. Todo los análisis de las muestras de orina enriquecidas se realizaron por triplicado.

3.6 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN S-HS.

3.6.1 Descripción de las condiciones experimentales de la técnica

Se empleó un automuestreador S-HS (Véase **Figura 8**), *Headspace sampler* HP 7694E (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con un carrusel portamuestras y un *loop* de 1 mL. Las temperaturas empleadas para el termostato, *loop* y línea de transferencia fueron 40, 60 y 80 °C, respectivamente.

La presurización del *vial* fue 18.5 psi; el nivel de la agitación fue bajo. Los tiempos utilizados en el automuestreador S-HS para el análisis cromatográfico de las muestras de orina aparecen en la **Tabla 10**.

Todos los experimentos realizados por esta técnica se efectuaron de la siguiente forma: En un *vial* para S-HS de 20 mL (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.) se vertieron 3 ó 6 mL de orina con una pipeta volumétrica de 1 ± 0.01 mL ó 2 ± 0.01 mL (*Brandt*, Wertheim, Alemania); luego, se adicionaron 0, 200, 400 ó 600 mg de NaCl (99.8%; *Carlo Erba Reagenti*; Rodano, Italia), dependiendo del porcentaje (p/v) de sal requerido; posteriormente, se adicionaron 120 μ L de la solución *stock*, con la jeringa tipo *Hamilton* de 10.0 ± 0.1 μ L e, inmediatamente, se colocaron una tapa de aluminio con abertura circular en el centro junto con un *septum* de butilo negro recubierto con teflón (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.).

Las tapas de aluminio (*Industria Metalmeccanica Charo Ltda*, Bogotá, Colombia) se sellaron con un encapsulador manual ajustable (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.). Las fases vapor extraídas se analizaron por HRGC/FID, bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 3.3**.

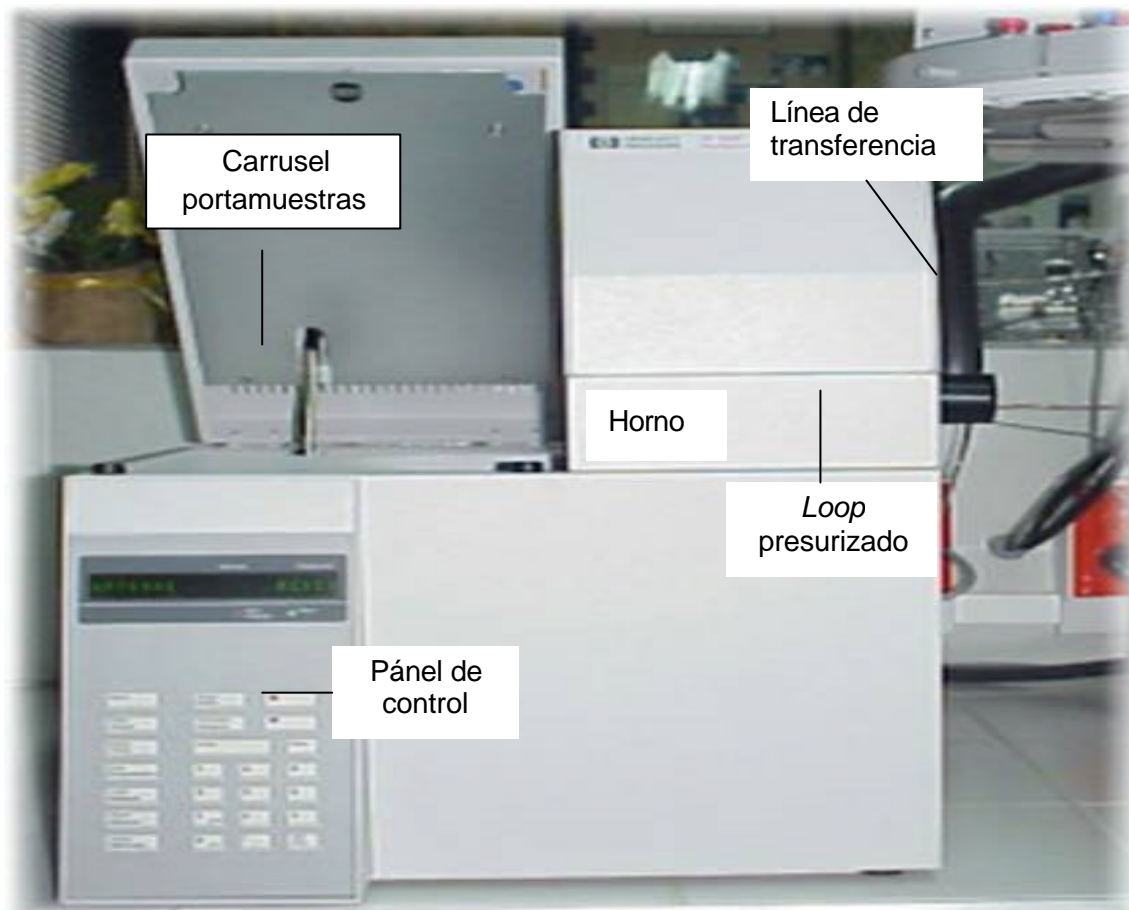


Figura 8. Automuestreador *Headspace sampler* HP 7694E, unido al cromatógrafo en línea.

Para obtener la sensibilidad y la reproducibilidad más altas posible, se realizaron ensayos de cada uno de los siguientes parámetros operacionales: tiempo y temperatura de termostatación del *vial*, volumen de orina, efecto del pH y *salting-out*.

TABLA 10. Tiempos utilizados en el automuestreador S-HS para el análisis cromatográfico de las muestras de orina.

Tiempos	Valores, min	Tiempos	Valores, min
Agitación	10	Termostatación del <i>vial</i>	10
Presurización del <i>vial</i>	0.03	Llenado del <i>loop</i>	0.1
Inyección	0.5	Ciclo GC	50
Equilibrio del <i>loop</i>	0.1		

3.6.2 Estudio de los efectos del tiempo y de la temperatura de termostatación del *vial* sobre la eficiencia de extracción.

Se ensayaron diferentes temperaturas, *i.e.* 40, 50 y 60 °C, para la termostatación del *vial* junto con los parámetros de agitación, presurización del *vial* y tiempos de eventos, que aparecen en el **Numeral 3.6.1**.

Las temperaturas del *loop* y de la línea de transferencia fueron 20 y 40 °C, por encima de la temperatura de termostatación del *vial*, respectivamente; no se utilizaron temperaturas de termostatación del *vial* más bajas puesto que el automuestreador está diseñado para trabajar a temperatura mayor de 40°C. La temperatura de termostatación del *vial* no se excedió 60 °C, para evitar una sobrepresurización del *vial*, a causa de la ebullición del metanol.

3.6.3 Estudio del volumen de orina, efecto del pH y *salting-out* sobre la eficiencia de extracción.

Se probaron volúmenes de orina dentro del *vial* de 3 y 6 mL. Para el estudio de los efectos *salting-out* y de pH, se procedió de igual forma que se describe en el **Numeral 3.5.4**.

3.7 OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÍNIMOS DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.

El nivel mínimo de detección (MDL) y el nivel mínimo de cuantificación (MQL) de las técnicas HS-SPME/HRGC/FID y S-HS/HRGC/FID se determinaron de la siguiente forma: para HS-SPME/HRGC/FID se vertió 2 mL de orina en el *vial* de 4 mL, se adicionaron 200 mg de NaCl y 10 μ L de solución metanólica, cada vez más diluida, con los hidrocarburos descritos en la **Tabla 4**, luego, a la fase vapor de la muestra de orina en el *vial*, se expuso una fibra de sílice fundida recubierta con PDMS de 100 μ m de espesor (*Supelco*, Catálogo N° 57310-U; Bellefonte, PA, EE.UU.), durante 15 min a 22 °C, para la extracción de los hidrocarburos. Seguidamente, se realizó la desorción de los compuestos absorbidos sobre la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, durante 10 min a 250 °C. Para S-HS/HRGC/FID se vertió 6 mL de orina en el *vial* para S-HS de 20 mL, se adicionaron 600 mg de NaCl y 10 μ L de solución metanólica cada vez más diluida, con los hidrocarburos descritos en la **Tabla 4**; se selló herméticamente y se colocó en el carrusel del automuestreador S-HS, para calentamiento a 40 °C durante 10 min. Finalmente, se realizó el análisis HRGC/FID a la fase vapor de la muestra.

Se tomó como límite de detección del método para cada compuesto, y cada una de las dos técnicas, aquella concentración mínima del analito en la muestra de orina, que genere una señal discernible en el cromatograma para señal : ruido (**S/N**) igual a 5; el nivel mínimo de cuantificación del método se fijó como dos veces el respectivo nivel mínimo de detección.

Para la cuantificación de los hidrocarburos se realizaron curvas de calibración con la técnica HS-SPME/HRGC/FID, utilizando las muestras de orina enriquecidas, que se describen en la **Tabla 7**, y se obtuvieron la ecuaciones con intercepto forzado al origen, similares a la presentada en la **Ecuación 2**.

$$A_i = m * C_i \quad (2)$$

Donde

- A_i : Área del pico del analito patrón;
 C_i : Concentración del analito patrón en la muestra de orina;
 m : Pendiente de la curva de calibración

La linealidad de la técnica HS-SPME/HRGC/FID, en el intervalo de concentraciones, que aparece en la **Tabla 7**, se estableció con base en los coeficientes de correlación de las curvas de calibración.

3.8 TOMA DE MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES DE UNA FÁBRICA DE CALZADO Y APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS.

Sólo se utilizó una de las dos técnicas de preparación de muestras propuestas, dependiendo de un análisis previo en cuanto a la reproducibilidad y, principalmente, la eficiencia de extracción, establecidas en experimentos previos con patrones.

Usando las mejores condiciones para la extracción y la técnica seleccionada, se evaluó la presencia de hidrocarburos en muestras de orina de 12 trabajadores de una fábrica del calzado de Bucaramanga. Los trabajadores, que suministraron sus muestras de orina para el análisis, eran todos de sexo masculino, no fumadores, personas que no presentaran enfermedades de consideración y que no hubieran ingerido bebidas alcohólicas durante los diez días antes de la toma de muestra.

La toma de la muestra se realizó un viernes al inicio (7:00 – 8:00 a.m.) y al término de la jornada laboral (6:30 - 7:30 p.m.). Por comodidad de los trabajadores, las muestras de orina se tomaron en vasos desechables de 300 mL, generalmente usados para el espendio de gaseosas, su contenido inmediatamente se transfirió a *viales* S-HS de 20 mL, que se sellaron herméticamente, se envolvieron en papel aluminio para proteger las muestras de la luz, y se mantuvieron en un congelador de una nevera (*Centrales*, Medellín, Colombia) a ± 2 °C. A los *viales* y vasos se le realizó el blanco respectivo previo al muestreo. El análisis de muestras se realizó durante los cuatro días posteriores al muestreo.

3.9 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN EL AIRE, AL INTERIOR DE LA FÁBRICA DE CALZADO.

Para la determinación de los niveles mínimos de detección de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos, se utilizó un bolsa para muestreo de gases, de teflón, de 3 L, *Tedlar* (*Apex Instruments*, Holly Springs, NC, EE.UU.) la cual se llenó con aire sintético cero (20.5% de O₂, 2.0 ppm de humedad; Aga Fano, Bucaramanga, Colombia), usando un sistema de muestreo (Véase **Figura 9**) M18 *VacBag Sampler System*, SK-M180 (*Apex Instruments*, Holly Springs, NC, EE.UU.), recomendado por la EPA, para el estudio de VOC's en aire (EPA, Método 18), el cual está conectado a una bomba para muestreo de gases TBP-102 (*Apex Instruments*, Holly Springs, NC, EE.UU.), que, a su vez, está equipado con rotámetro, flujómetro y cronómetro, debidamente calibrados.



En la bolsa, llena de aire, se inyectaron alícuotas de 10 μL de soluciones metanólicas de la mezcla de hidrocarburos descritos en la **Tabla 4** (Véase **Figura 10**), cada vez más diluidas para obtener concentraciones en aire inferiores a 50 ppbv de cada uno de los compuestos; posteriormente, se expuso dentro de la bolsa una fibra de sílice fundida recubierta con PDMS de 100 μm de espesor (*Supelco*, Catálogo N° 57310-U; Bellefonte, PA, EE.UU.), durante 15 min a 22 °C, para la extracción de los hidrocarburos (Véase **Figura 11**). Seguidamente, se realizó la desorción de los compuestos absorbidos sobre la fibra en el puerto de inyección



Figura 10. Adición de la mezcla de hidrocarburos a la bolsa *Tedlar*.

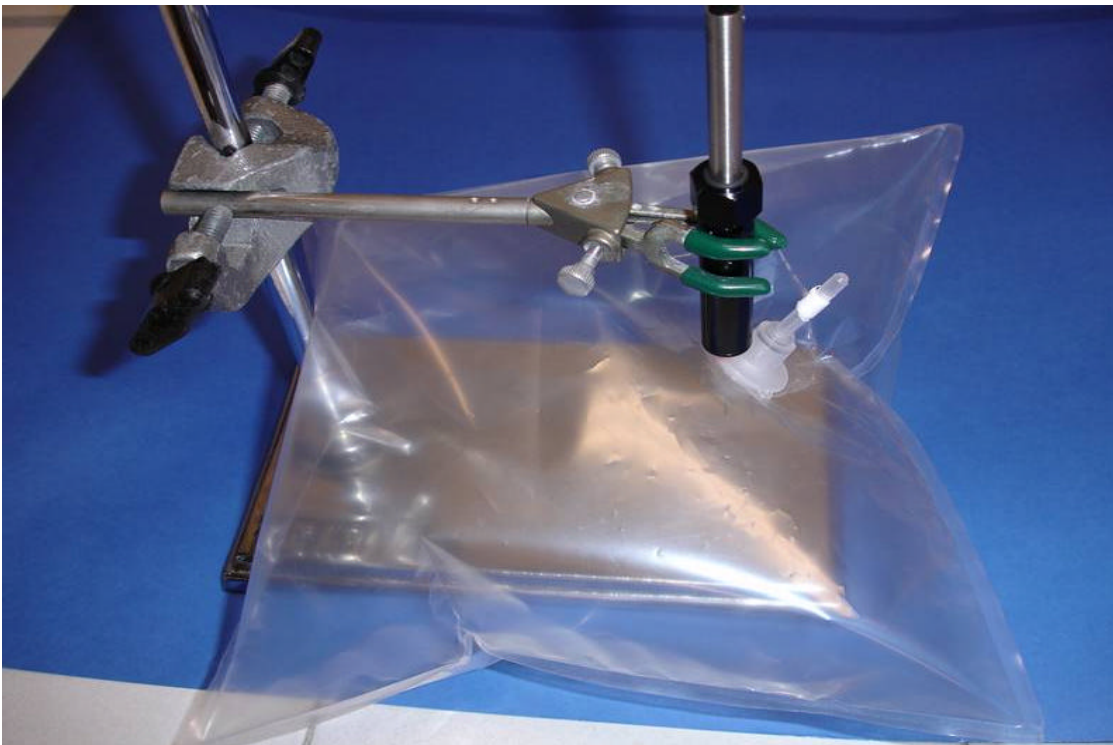


Figura 11. Exposición de la fibra de PDMS (100 mm) al contenido de la bolsa *Tedlar*.

del cromatógrafo de gases, descrito en el **Numeral 3.3**, durante 10 min a 250 °C. Con las concentraciones de los hidrocarburos dentro de la bolsa de aire, con las cuales se obtuvieron relaciones señal/ruido (S/N) en el cromatograma de aproximadamente 5, se establecieron los niveles mínimos de detección de cada compuesto.

Para la cuantificación de los hidrocarburos en el aire, al interior de la fábrica, se realizaron curvas de calibración con la técnica HS-SPME/HRGC/FID, utilizando una bolsa *Tedlar* llena de aire, a la cual se le adicionó una alícuota de una solución metanólica con la mezcla de hidrocarburos, descritos en la **Tabla 4**; para obtener un rango de concentraciones de 1 a 50 ppbv en el aire contenido en la bolsa.

El muestreo se hizo dos veces (muestréos A y B), en forma similar, en los sectores del a fábrica donde se estaban usando pegamentos y limpiadores (Véase **Figura 12**). La única diferencia entre los dos muestréos fue la trayectoria realizada con la sonda. Para las dos muestréos el extremo de la sonda se colocaba en el aire, que estuviera a una distancia mayor de 50 cm de los recipientes que contenían los pegamentos (A) y en la zona de respiración de los trabajadores (espacio circundante al olfato) (B). El flujo de aire durante el muestreo se mantuvo a 500 mL/min.



A



Figura 12. Muestras de aire al interior de la fábrica de calzado en: El aire alejado de los recipientes de pegamento (A) y Zona de respiración de los trabajadores (B).

4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 REALIZACIÓN DE LA ENCUESTA A LOS TRABAJADORES QUE LABORAN EN LA MANUFACTURA DEL CALZADO.

Los resultados de la encuesta realizada a los 12 trabajadores (Véase **Anexo 1**), que suministraron las muestras de orina, mostraron, que la mayoría de ellos padecen con frecuencia dolores de cabeza, estrés, debilidad, depresión y dolor de ojos en las horas de la tarde; ninguno utiliza máscara de respiración; el salario depende directamente del número de zapatos terminados; el nivel de alfabetización es muy bajo y algunos de ellos antes eran los llamados “habitantes de la calle “. El principal pegamento utilizado fue el “PC-2000”. Durante la jornada laboral, los trabajadores tienen dos descansos de 20 min cada uno, uno en la mañana y otro en la tarde.

4.2 ANÁLISIS DEL PEGANTE “PC-2000” POR HS-SPME/GC-MS.

En el **Anexo 2.1** aparecen los compuestos identificados en la fase vapor del pegante “PC-2000”, su cantidad relativa (%), y los espectros de masas de las sustancias mayoritarias (total, ca. 88%). Los componentes más abundantes fueron tolueno (53.6 %), 2-metil-pentano (9.6 %), *n*-hexano + acetato de etilo (8.2 %), 3-metil-pentano (6.2 %) y 2-metil-hexano + 2,3-dimetil-pentano (6.2 %). La cantidad relativa del *n*-heptano fue del 1 %. El etilbenceno y los tres isómeros del xileno se encontraron en el *headspace* a nivel de trazas; mientras que, el benceno y el ciclohexeno no fueron detectados en la fase vapor de la muestra bajo estudio. La corriente iónica total reconstruida (cromatograma) de la fase vapor del pegante “PC-2000”, obtenida por HS-SPME/GC-MS, se presenta en el **Anexo 2.2**.

4.3 SISTEMA DE DETECCIÓN CROMATOGRÁFICO GC-FID.

Utilizando los parámetros operacionales e instrumentales descritos en el **Numeral 3.3** de la Parte Experimental, para HRGC-FID, se obtuvo el perfil cromatográfico típico de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos usados en la estandarización de las condiciones de extracción, por las técnicas S-HS y HS-SPME, que aparece en la **Figura 13**. Aunque el clorobenceno eluye después de los analitos estudiados, debido a su estructura muy similar a la de los BTEX's, se consideró adecuado su uso como estándar interno (Istd).

4.4 DETERMINACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN ABSOLUTOS Y RELATIVOS, ÁREAS ABSOLUTAS Y RELATIVAS.

Los coeficientes de variación (CV) para las áreas absolutas y relativas de los picos cromatográficos no superaron el 10 %, lo cual es aceptado de acuerdo con lo estipulado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), de igual forma, se estimaron estos valores para los t_R y los t_{RR} , los cuales no superaron el 2 %. En las **Tablas 11-14** se presentan los resultados obtenidos para el tolueno; para otros hidrocarburos, los respectivos valores aparecen en los **Anexos 3- 6**. Se calcularon las áreas para cada uno de los compuestos en forma individual, y no como hidrocarburos totales, puesto que desde el punto de vista toxicológico cada uno de estos compuestos presenta un comportamiento diferente.

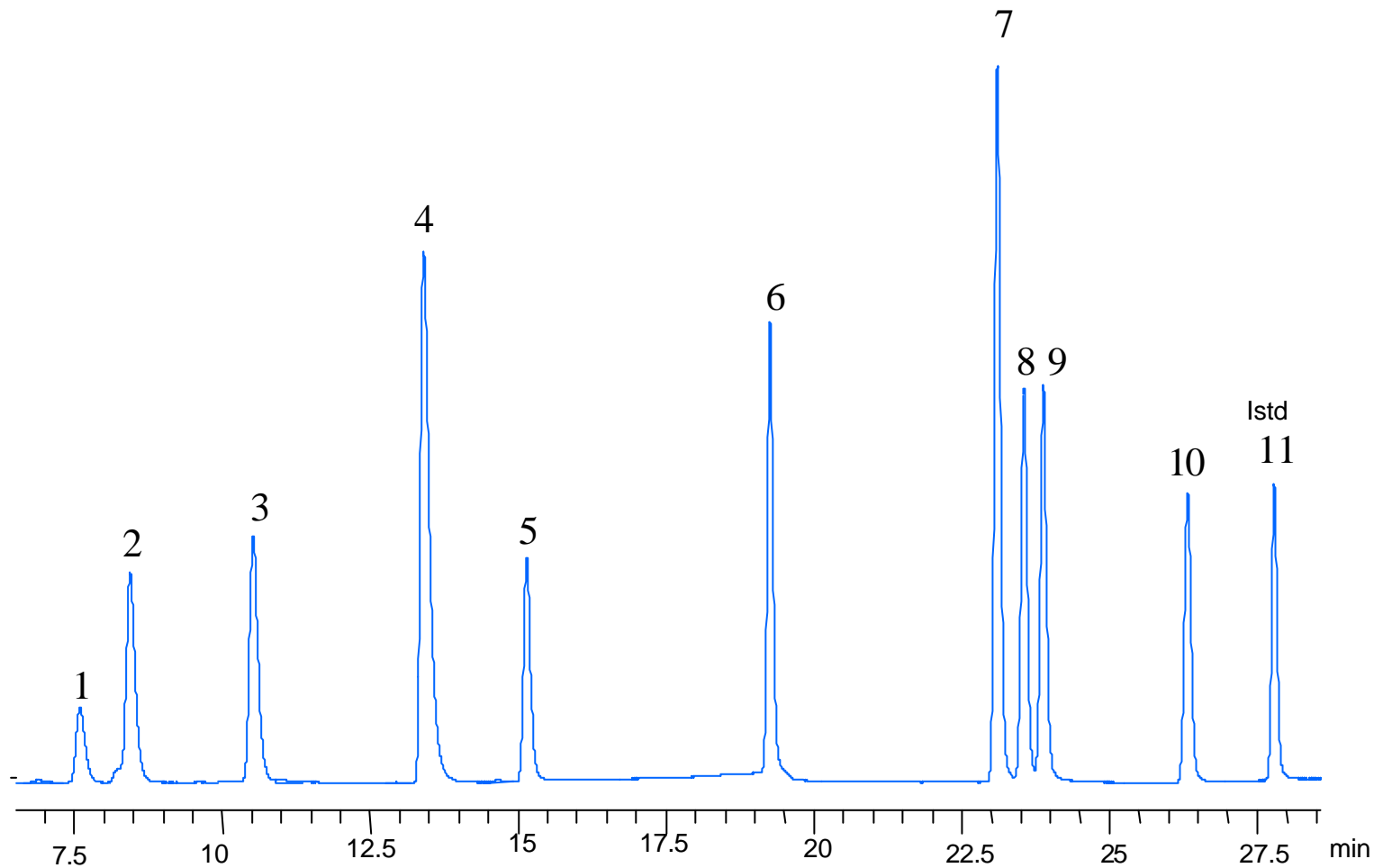


Figura 13. Perfil cromatográfico típico de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos usados en la estandarización de las condiciones de extracción, por las técnicas S-HS y HS-SPME. 1- *n*-hexano; 2- Benceno; 3- Ciclohexeno; 4- Metanol; 5- *n*-Heptano; 6- Tolueno; 7- Etilbenceno; 8- *p*-Xileno; 9- *m*-Xileno; 10- *o*-Xileno; 11- Clorobenceno (Istd).

TABLA 11. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos para el tolueno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n =3)	\bar{t}_{istd} , min (n =3)	\bar{t}_{RR} (n =3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
10	19,3	27.8	0,692	0.15569	0.00037	0,00137	0,8	0.001	0,2
17	19,15	27.7	0,692	0.06300	0.48908	0,00031	0,3	1.8	0,05
36	19,1	27.6	0,691	0.11059	0.10621	0,00138	0,6	0.4	0,2
52	19,1	27.6	0,691	0.11865	0.11752	0,00135	0,6	0.4	0,2
260	19,1	27.6	0,692	0.10886	0.10941	0,00120	0,6	0.4	0,2
520	19,2	27.7	0,692	0.36071	0.42062	0,00257	2,0	1.5	0,4

TABLA 12. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos para el tolueno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n =3)	\bar{t}_{istd} , min (n =3)	\bar{t}_{RR} (n =3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
10	19.06	27.8	0,6889	0.04	0.00037	0,00049	0.2	0.001	0,05
26	19.07	27.7	0,6890	0.09	0.48908	0,00044	0.5	1.8	0,1
52	19.09	27.6	0,6890	0.01	0.10621	0,00069	0.06	0.4	0,04
78	19.08	27.6	0,6686	0.05	0.11752	0,00016	0.2	0.4	0,04
104	19.08	27.6	0,6891	0.09	0.10941	0,00058	0.5	0.4	0,09
312	18.98	27.7	0,6887	0.08	0.42062	0,00041	0.4	1.5	0,09

TABLA 13. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas para tolueno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	320	3840	0,084	22	97	0,0057	7.0	2.5	7.0
17	1060	3910	0,27	61	57	0,0157	6.0	1.5	6.0
36	2530	3890	0,65	49	58	0,0217	2.0	1.5	3.0
52	4140	3840	1,078	72	95	0,0084	2.0	2.5	1.0
260	22500	3760	5,99	204	68	0,0591	1.0	1.8	1.0
520	37100	3830	9,7	668	73	0,3427	2.0	1.9	4.0

TABLA 14. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas para tolueno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	530	3907	0.136	16	57	0.003	3.0	1.5	2.0
26	2650	3892	0.678	15	58	0.009	1.0	1.5	1.0
52	5763	3842	1.48	147	95	0.060	3.0	2.5	4.0
78	7811	3757	2.03	221	68	0.013	3.0	1.8	1.0
104	9625	3832	2.56	235	73	0.042	2.0	1.9	2.0
312	32798	3532	8.6	820	100	0.374	3.0	2.8	4.0

4.5 ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN HS-SPME Y S-HS.

Siguiendo el procedimiento descrito en los **Numerales 3.5 y 3.7** de la Parte Experimental, se obtuvieron las condiciones de análisis bajo las cuales se presentaba la eficiencia de extracción más alta, para las técnicas HS-SPME y S-HS. En las **Tablas 15 y 16** se presentan los resultados para el tolueno y los isómeros *m*-, *o*- y *p*- xilenos, obtenidos para las técnicas S-HS y HS-SPME, respectivamente, en las **Figuras 14-25** se presentan en forma gráfica los valores de las **Tablas 15 y 16**; para el resto de hidrocarburos los resultados se reportan en los **Anexos 7 y 8**.

En la **Tabla 17** aparecen las condiciones experimentales bajo las cuales se obtuvieron, en promedio, las mejores eficiencias de extracción para las técnicas S-HS y HS-SPME.

Se encontró que la “mejor” temperatura de extracción fue la más baja de las 3 estudiadas; la explicación a lo anterior yace en que los BTEX's e hidrocarburos alifáticos estudiados presentan un alto coeficiente de partición fase-gas/fase-acuosa [48] (para el tolueno, por ejemplo, el coeficiente de partición orina/ aire, K, es de 3.3 ± 0.9 [11]), que les permite pasar a la fase vapor, fácilmente, para luego ser absorbidos por la fibra, sin embargo, con el aumento de la temperatura, el coeficiente de partición fase-vapor/fibra también aumenta, y, por lo tanto, ocurre más fácilmente la desorción de los analitos de la fibra.

Además, cuando se expone la fibra por un determinado tiempo, los compuestos volátiles se desplazan por los menos volátiles de mayor K. Algunos compuestos menos volátiles presentes en la orina pueden pasar con el tiempo a la fase vapor y competir con los analitos de interés. Lo anterior se demuestra con el incremento del área cromatográfica para el *n*-tetradecano (Véase **Anexos 8.3.6 y 8.3.8**); a

medida que se aumenta la temperatura o el tiempo de exposición de la fibra un mayor número de moléculas de *n*-tetradecano pasa a la fase vapor y, luego, a la fibra.

TABLA 15. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y o-xileno, bajo diferentes condiciones.

Compuesto	Tolueno			o-Xileno			
	Parámetro	Área	s	CV, %	Área	s	CV, %
Volumen de orina, mL	3	1,250E+06	8,214E+04	7	1,070E+06	9,163E+04	9
	6	2,140E+06	4,182E+04	2	1,680E+06	4,208E+04	3
Tiempo de termostatación del vial, min	10	3,270E+06	8,300E+04	3	2,770E+06	3,359E+04	1
	20	2,800E+06	1,490E+05	5	2,400E+06	1,765E+05	7
	30	2,870E+06	3,638E+04	1	2,400E+06	8,200E+04	3
Temperatura de termostatación del vial, °C	40	3,270E+06	8,300E+04	3	2,770E+06	3,359E+04	1
	50	2,500E+06	1,485E+05	6	2,200E+06	1,163E+05	5
	60	2,110E+06	6,951E+04	3	1,660E+06	4,088E+04	2
pH de la orina	2	2,850E+06	9,615E+04	3	2,520E+06	9,018E+04	4
	7	3,270E+06	8,300E+04	3	2,770E+06	3,359E+04	1
	12	2,800E+06	1,696E+05	6	1,600E+06	1,179E+05	7
Adición de sal (% de NaCl)	0	3,270E+06	8,300E+04	3	2,770E+06	3,359E+04	1
	10	3,600E+06	2,491E+05	7	2,800E+06	1,247E+05	4
	20	3,460E+06	6,422E+04	2	2,870E+06	6,654E+04	2
	30	3,200E+06	1,297E+05	4	2,600E+06	1,032E+05	4

TABLA 16. Estudio de la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS 100 mm) del tolueno y (*m*- + *p*-) xilenos, modificando las condiciones de extracción.

Compuesto		Tolueno			<i>(m</i> - + <i>p</i> -) Xilenos		
Parámetro		Área	s	CV, %	Área	s	CV, %
pH de la orina	2	8,900E+05	3,559E+04	4	4,200E+06	1,262E+05	3
	7	9,800E+05	4,977E+04	5	5,000E+06	1,455E+05	3
	12	8,900E+05	2,663E+04	3	4,400E+06	2,144E+05	5
Temperatura del vial (°C)	22	9,800E+05	4,977E+04	5	5,000E+06	1,455E+05	3
	40	9,900E+05	4,721E+04	5	5,100E+06	2,040E+05	4
	60	9,400E+05	1,889E+04	2	4,300E+06	1,303E+05	3
Adición de sal (NaCl, % P/V)	0	9,800E+05	4,977E+04	5	5,000E+06	1,455E+05	3
	10	9,900E+05	2,864E+04	3	4,500E+06	2,473E+05	5
	20	1,200E+06	4,369E+04	4	4,700E+06	1,976E+05	4
	30	1,070E+06	5,800E+04	5	3,500E+06	2,269E+05	6
Tiempo de exposición de la fibra, min	2	9,500E+05	1,950E+04	2	4,320E+06	8,655E+04	2
	5	8,900E+05	1,842E+04	2	4,300E+06	1,120E+05	3
	10	9,900E+05	3,699E+04	4	4,900E+06	2,869E+05	6
	15	9,800E+05	4,977E+04	5	5,000E+06	1,455E+05	3
	30	9,200E+05	4,895E+04	5	4,900E+06	2,110E+05	4

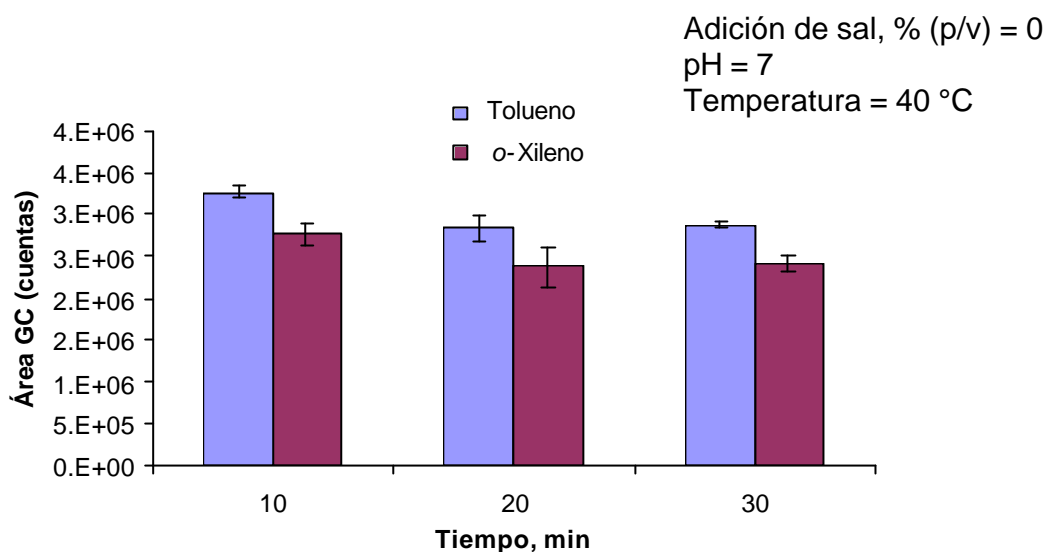


Figura 14. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y o-xileno, bajo diferentes tiempos de termostatación del *vial*.

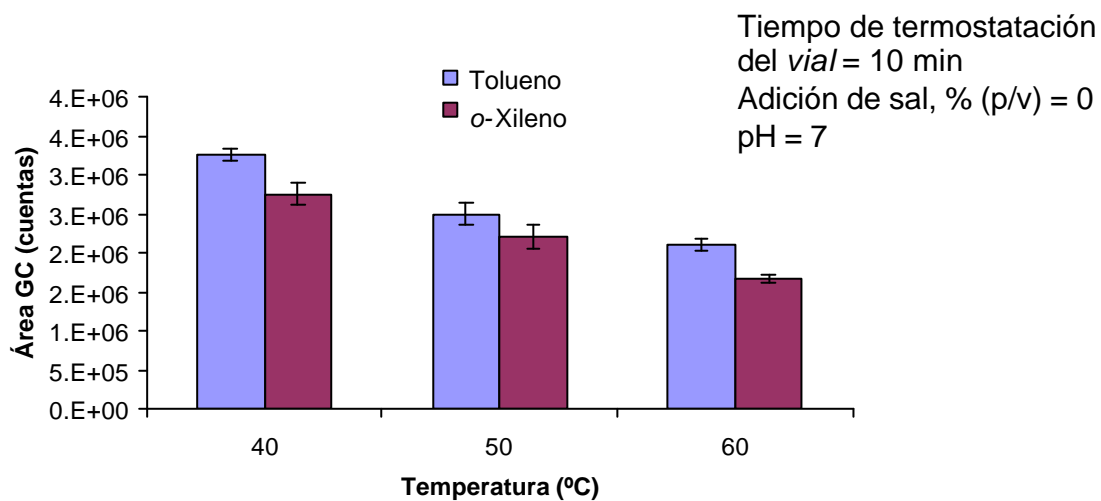


Figura 15. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y o-xileno, bajo diferentes temperaturas de termostatación del *vial*.

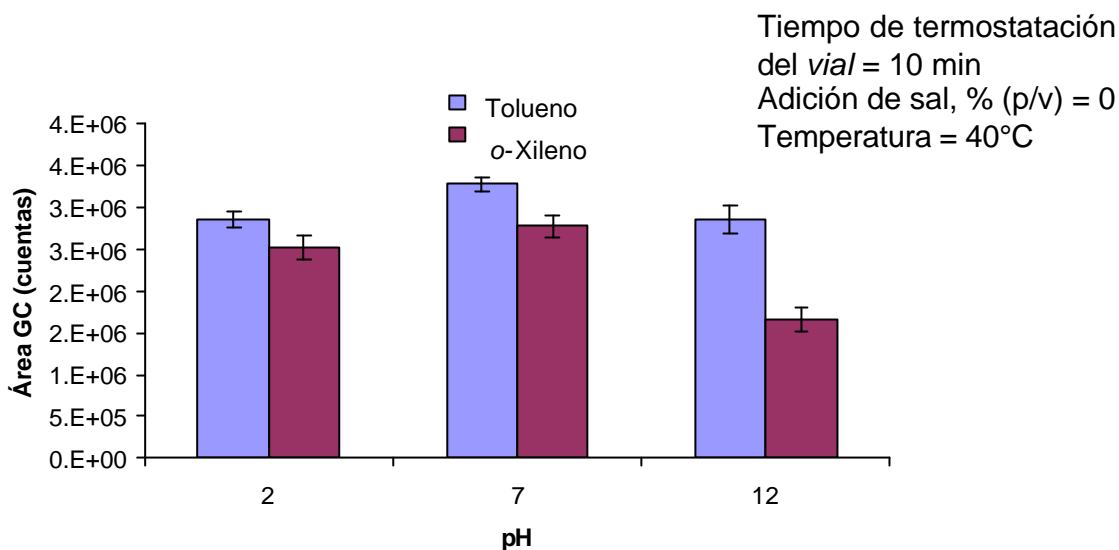


Figura 16. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y o-xileno, a diferentes pH.

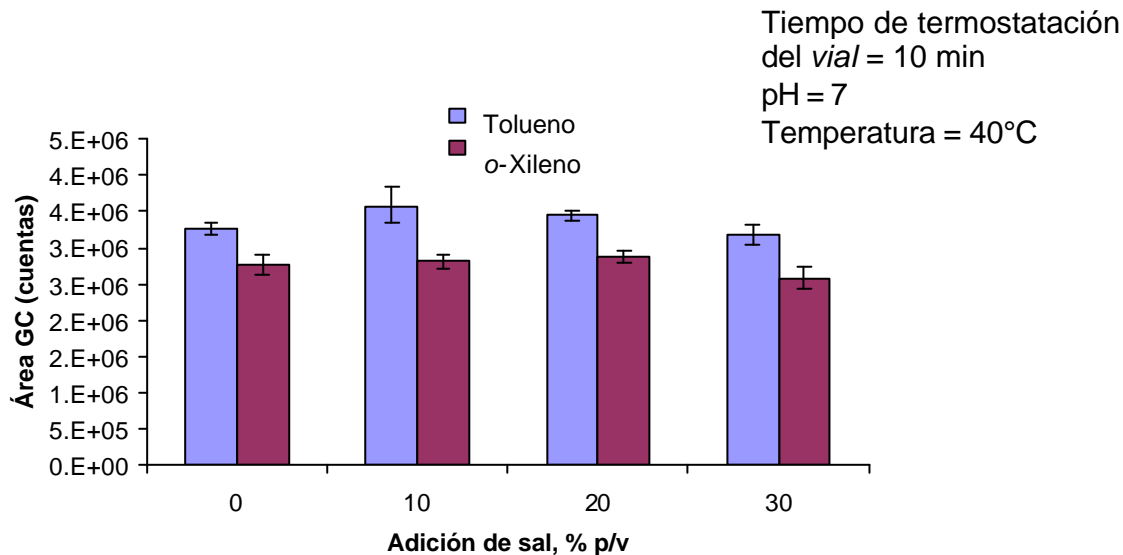


Figura 17. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del tolueno y o-xileno, con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.

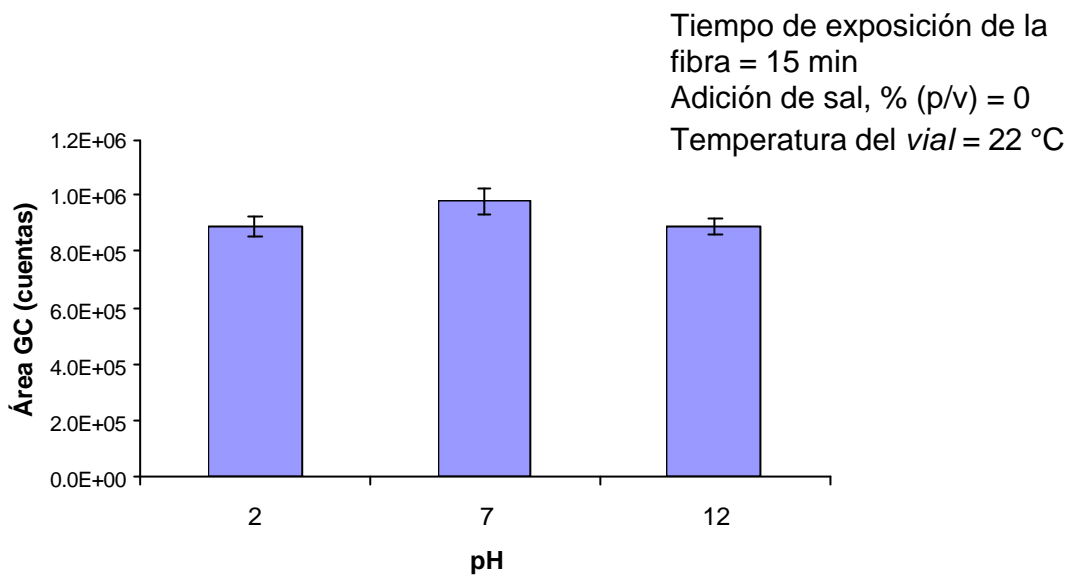


Figura 18. Estudio de la eficiencia de extracción del tolueno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.

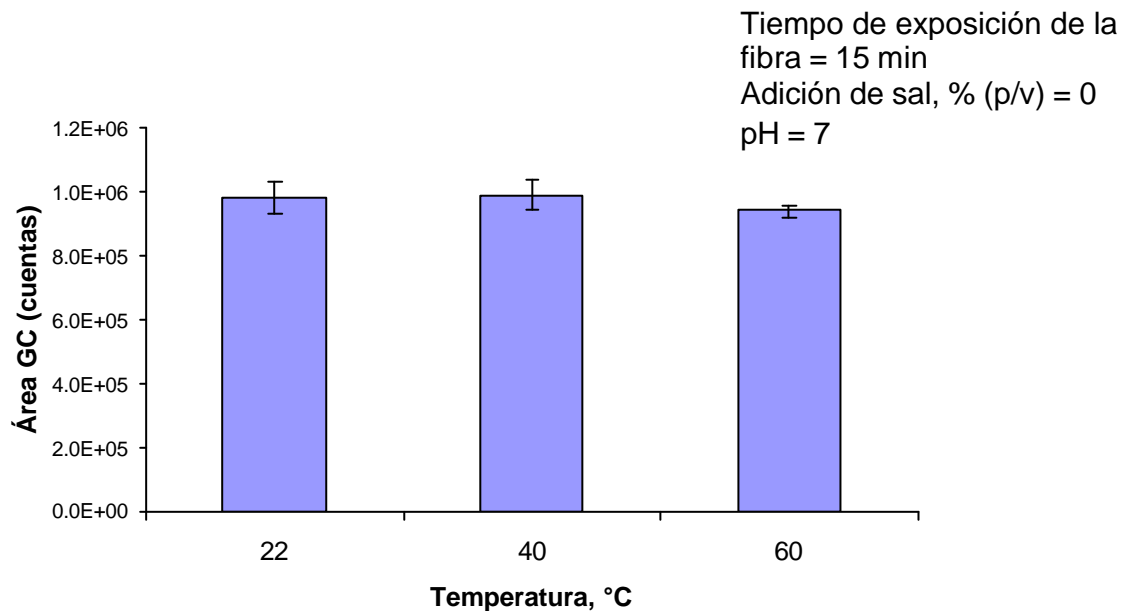


Figura 19. Estudio de la eficiencia de extracción del tolueno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), bajo diferentes temperaturas del *vial*.

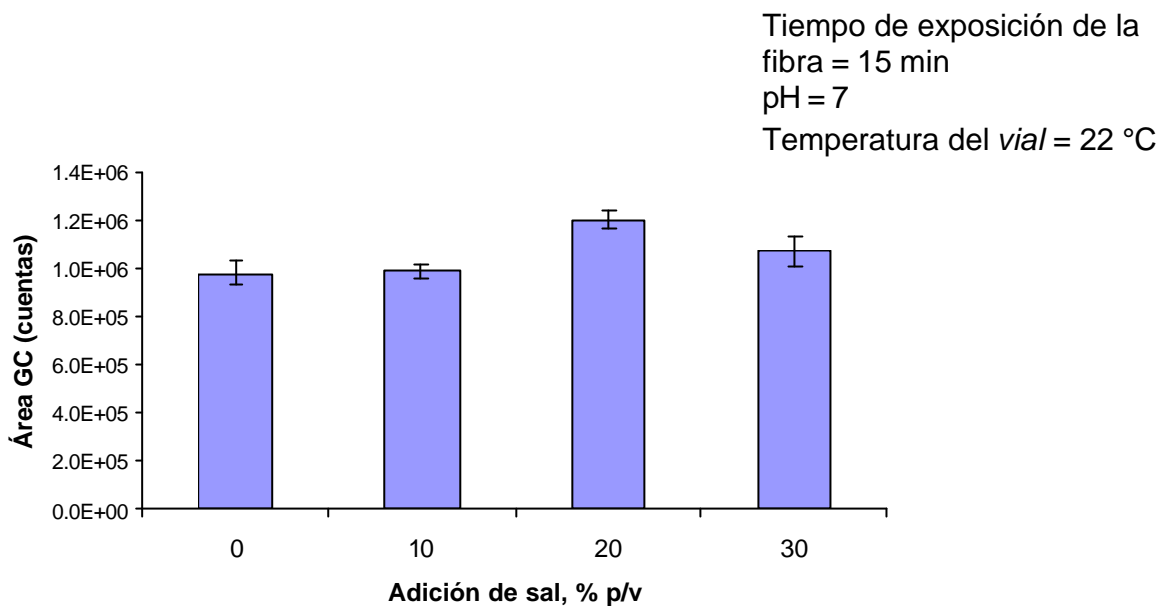


Figura 20. Estudio de la eficiencia de extracción del tolueno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.

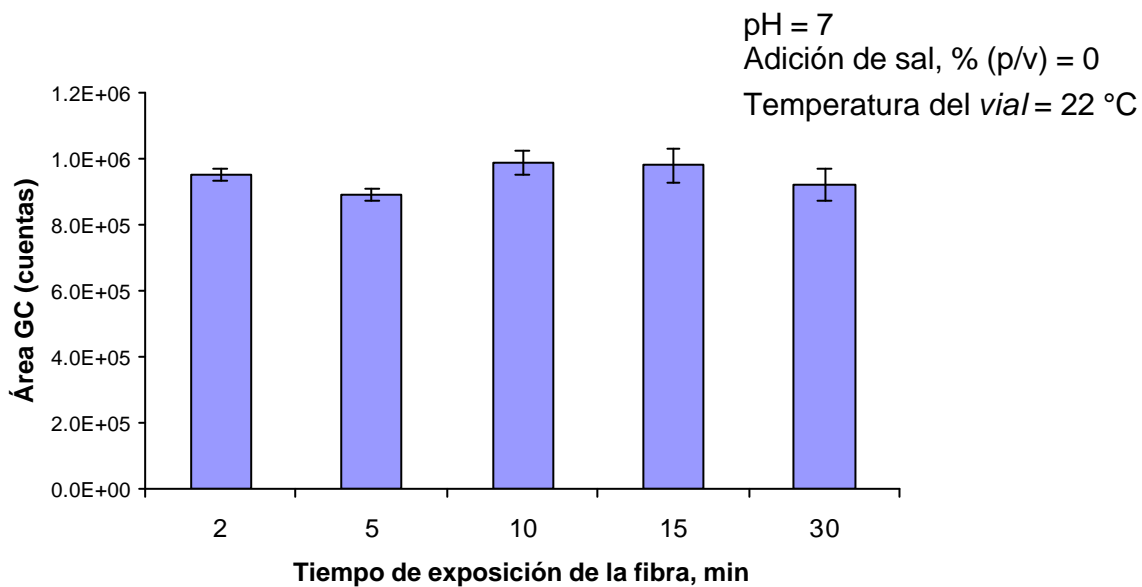


Figura 21. Estudio de la eficiencia de extracción del tolueno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes tiempos de exposición de la fibra.

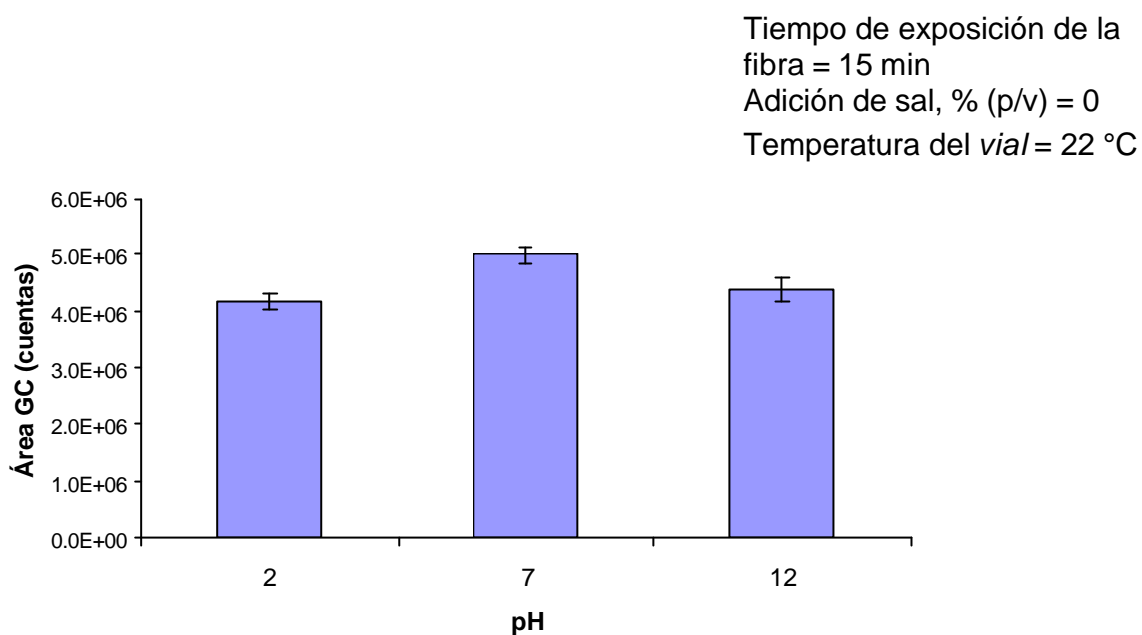


Figura 22. Estudio de la eficiencia de extracción de (*p*- + *m*-) xilenos, aislados por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.

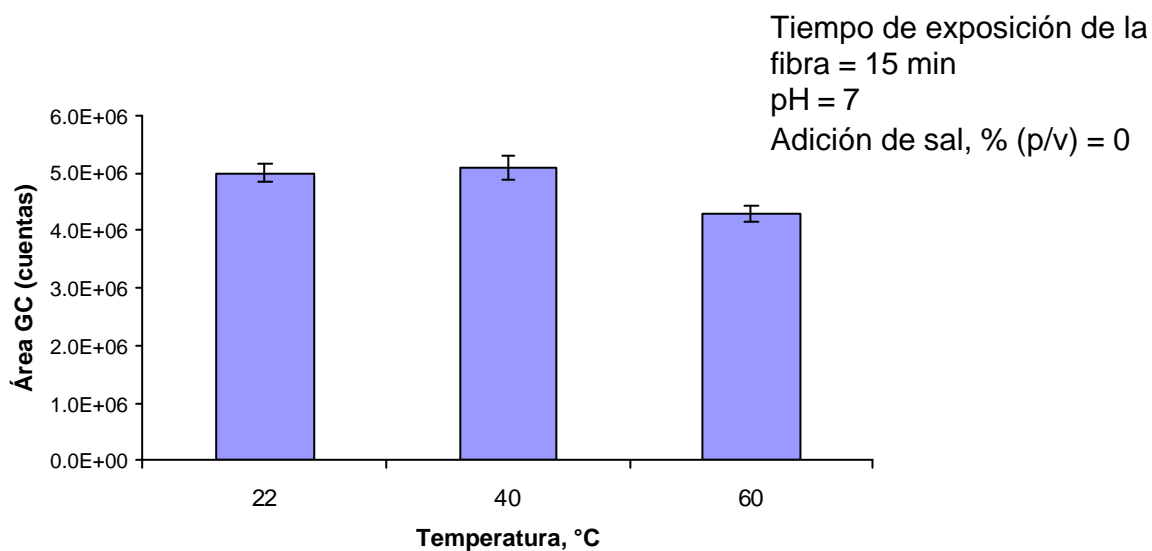


Figura 23. Estudio de la eficiencia de extracción de (*p*- + *m*-) xilenos, aislados por HS-SPME (PDMS, 100 mm), bajo diferentes temperaturas del *vial*.

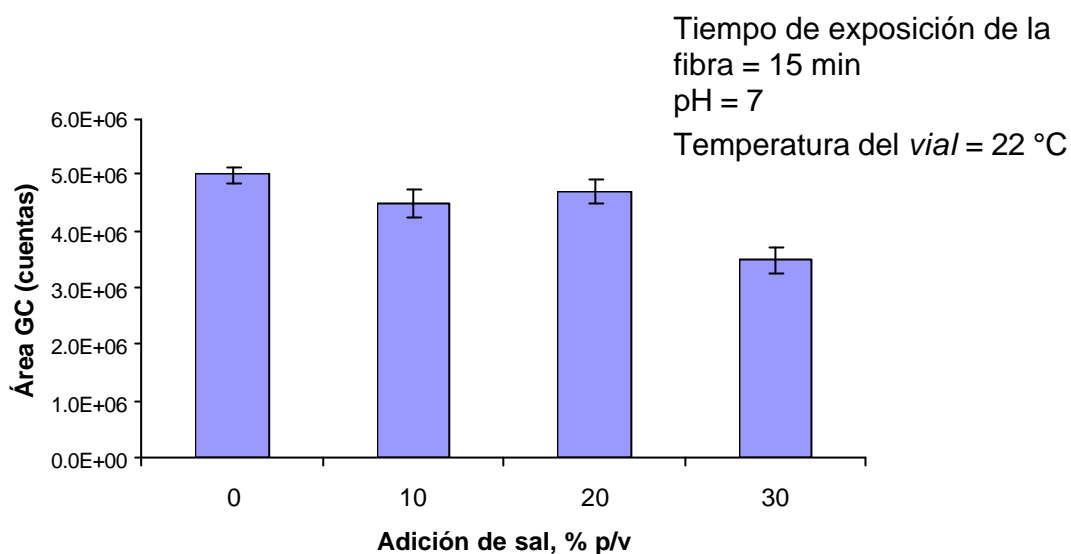


Figura 24. Estudio de la eficiencia de extracción de (*p*- + *m*-) xilenos, aislados por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.

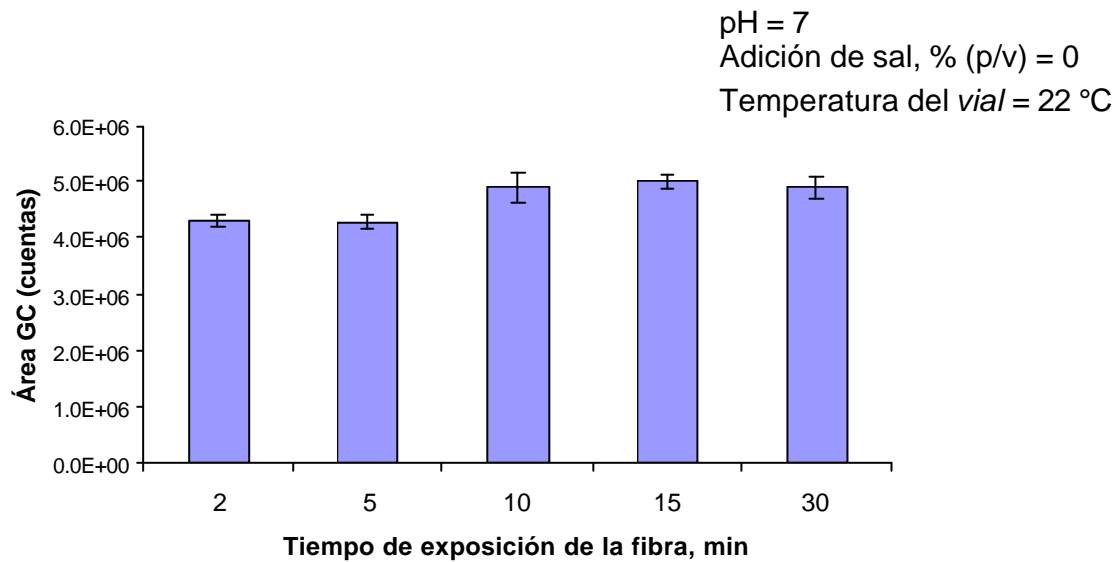


Figura 25. Estudio de la eficiencia de extracción de (*p*- + *m*-) xilenos, aislados por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes tiempos de exposición de la fibra.

TABLA 17. Condiciones de extracción de los hidrocarburos alifáticos y BTEX's por las técnicas S-HS y HS-SPME.

S-HS			HS-SPME		
Parámetros	Estudiados	Seleccionados	Parámetros	Estudiados	Seleccionados
Tiempo de termostatación del <i>vial</i> (min)	10, 20, 30	10	Tiempo de exposición de la fibra (min)	2, 5, 10, 15, 30	15
Temperatura del <i>vial</i> ,°C	40, 50, 60	40	Temperatura del <i>vial</i> ,°C	22, 40, 60	22
pH de la orina	2, 7, 12	7	pH de la orina	2, 7, 12	7
Adición de sal (NaCl, p/v %)	0,10, 20, 30	10	Adición de sal (NaCl, p/v %)	0,10, 20, 30	10
Volumen de muestra (mL)	3, 6	6	Volumen de muestra (mL)	2	2

También se encontró, que la adición de NaCl (p/v 10%) incrementó la eficiencia de extracción de los hidrocarburos. La explicación a lo anterior, sin ser demostrada en forma experimental, puede estar en que con el aumento de fuerza iónica de la orina, el radio de la esfera de solvatación de los analitos disminuye y, por consiguiente, se facilita la migración de éstos de la fase condensada a la fase vapor.

4.6 OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÍNIMOS DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.

En la **Tabla 18** se presentan los niveles mínimos de detección del método para los hidrocarburos, aislados en muestras de orina por S-HS y HS-SPME y analizados

por HRGC-FID, utilizando las mejores condiciones de extracción. Los niveles mínimos se establecieron para una concentración de analito cuya relación señal/ruido en el respectivo cromatograma obtenido fuera igual a 5. Se encontró que, en general, para los BTEX's la técnica HS-SPME/HRGC/FID presentó límites de detección más bajos, debido al proceso de extracción y concentración simultáneas, en comparación con la técnica S-HS/HRGC/FID, donde no ocurre el enriquecimiento de extracto con analitos.

TABLA 18. Niveles mínimos de detección del método ($\mu\text{g/L}$), de los hidrocarburos presentes en muestras de orina obtenidos por S-HS/GC/FID y HS-SPME/GC/FID.

Compuesto	S-HS	HS-SPME	Compuesto	S-HS	HS-SPME
<i>n</i> -Hexano	4.9	3.9	Etilbenceno	4.2	0.52
<i>n</i> -Heptano	10.3	10.3	<i>p</i> -Xileno	4.1	1.3
Ciclohexeno	8.5	3.0	<i>m</i> -Xileno	4.2	0.52
Benceno	6.8	2.4	<i>o</i> -Xileno	6.8	1.4
Tolueno	4.2	2.6			

Usando la técnica HS-SPME/HRGC/FID se lograron obtener los límites de detección para BTEX's más bajos, en comparación con los de hidrocarburos alifáticos. Lo anterior se debe a que los BTEX's presentan un potencial de ionización menor que los hidrocarburos alifáticos, y, por consiguiente, las partículas de estos compuestos que se forman en el FID tienen una menor función de trabajo y, por tanto, generan una señal mayor para la misma cantidad de moléculas.

Con el fin de comparar los niveles de detección obtenidos, en la **Tabla 19** se presentan los niveles mínimos de detección obtenidos por otros investigadores, quienes usaron métodos *headspace* dinámico y cromatógrafos equipados con inyectores para purga y trampa [3] e inyectores de trampa de enfriamiento-desorción térmica [18]; también se usó la técnica HS-SPME pero con detector selectivo de masas (MSD) [10, 28].

TABLA 19. Límites de detección en la determinación de BTEX's en orina, obtenidos por los investigadores [3, 10, 18, 28], utilizando sistemas analíticos similares.

Analito	Límite de detección (ng/L, ppt)			
	10 mL de orina, (HS-dinámico)-GC/FID [3]	20 mL de orina, (HS-dinámico)-GC/FID [18]	2 mL de orina, HS-SPME/GC-MS [10]	2 mL de orina, HS-SPME/GC-MS [28]
Benceno	25	15	5	25
Tolueno	15	8	5	34
Etilbenceno	35	11	10	12
(<i>m</i> - + <i>p</i> -) Xilenos	26	50	10	23
<i>o</i> -Xileno	30	20	10	15

Si se tiene en cuenta el volumen de orina empleado y el aumento del costo por muestra con los equipos utilizados por otros investigadores [3, 10, 18, 28], se puede afirmar, que los niveles mínimos de detección que se obtuvieron en el presente estudio son aceptables para los propósitos con los cuales se implementó el método.

Teniendo en cuenta, que de técnica HS-SPME/HRGC/FID presentó niveles mínimos de detección más bajos para la mayoría de compuestos y que, algunos analitos presentes en las muestras de orina reales no son detectados por la técnica S-HS, se decidió realizar curva de calibración sólo para la técnica HS-SPME/HRGC/FID, usando la **Ecuación 2** (Véase **Tabla 20**).

TABLA 20. Curva de calibración (ecuación) para los hidrocarburos bajo estudio, empleada para su cuantificación por la técnica HS-SPME/HRGC/FID.

Hydrocarburos	m (n = 3)	R ²
<i>n</i> -Hexano	39	0.9974
<i>n</i> -Heptano	29	0.9997
Ciclohexeno	65	0.9983
Benceno	112	0.9994
Etilbenceno	227	0.9997
Tolueno	104	0.9992
<i>m</i> -Xileno	235	0.9997
<i>o</i> -Xileno	216	0.9980
<i>p</i> -Xileno	225	0.9994

La linealidad de la técnica analítica seleccionada se estableció con base en el coeficiente de correlación (R²) de la curva de calibración para cada uno de los compuestos.

4.7 APLICACIÓN DE HS-SPME/HRGC/FID PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES QUE LABORAN EN LA MANUFACTURA DEL CALZADO.

Un perfil cromatográfico típico de los compuestos presentes en la fase vapor de una muestra de orina de un trabajador de una fábrica de calzado, aislados por HS-SPME y analizados por HRGC-FID, aparece en la **Figura 26**. Los cromatogramas obtenidos de los blancos del solvente (metanol) y HS-SPME/HRGC/FID de la muestra blanco, se presentan en el **Anexo 9**.

En la **Tabla 21** se registran las concentraciones de tolueno, etilbenceno y *m*-xileno ($\mu\text{g/L}$) en muestras de orina de trabajadores de una fábrica de calzado. La cuantificación se realizó por la técnica HS-SPME/HRGC/FID. Se observa, que el tolueno es el hidrocarburo presente en mayor cantidad en las muestras de orina y que su concentración se incrementa de 2 a 3 veces al término de la jornada laboral. Lo anterior sugiere también la necesidad de un estudio epidemiológico más profundo en los trabajadores sobre patrones de esterilidad, puesto que de acuerdo con lo publicado por Xiao y colaboradores [49], existe una relación directa entre la cantidad de esta sustancia presente en el semen y el tiempo de su licuefacción, que afecta la motilidad espermática.

En el caso de *n*-hexano, sólo en las muestras de orina de los voluntarios 3, 5 y 10 aparece este compuesto al término de la jornada laboral, en concentración entre los niveles mínimos de detección y de cuantificación. El benceno, *o*-xileno, *n*-heptano y ciclohexeno no se encontraron por encima de sus niveles mínimos de detección.

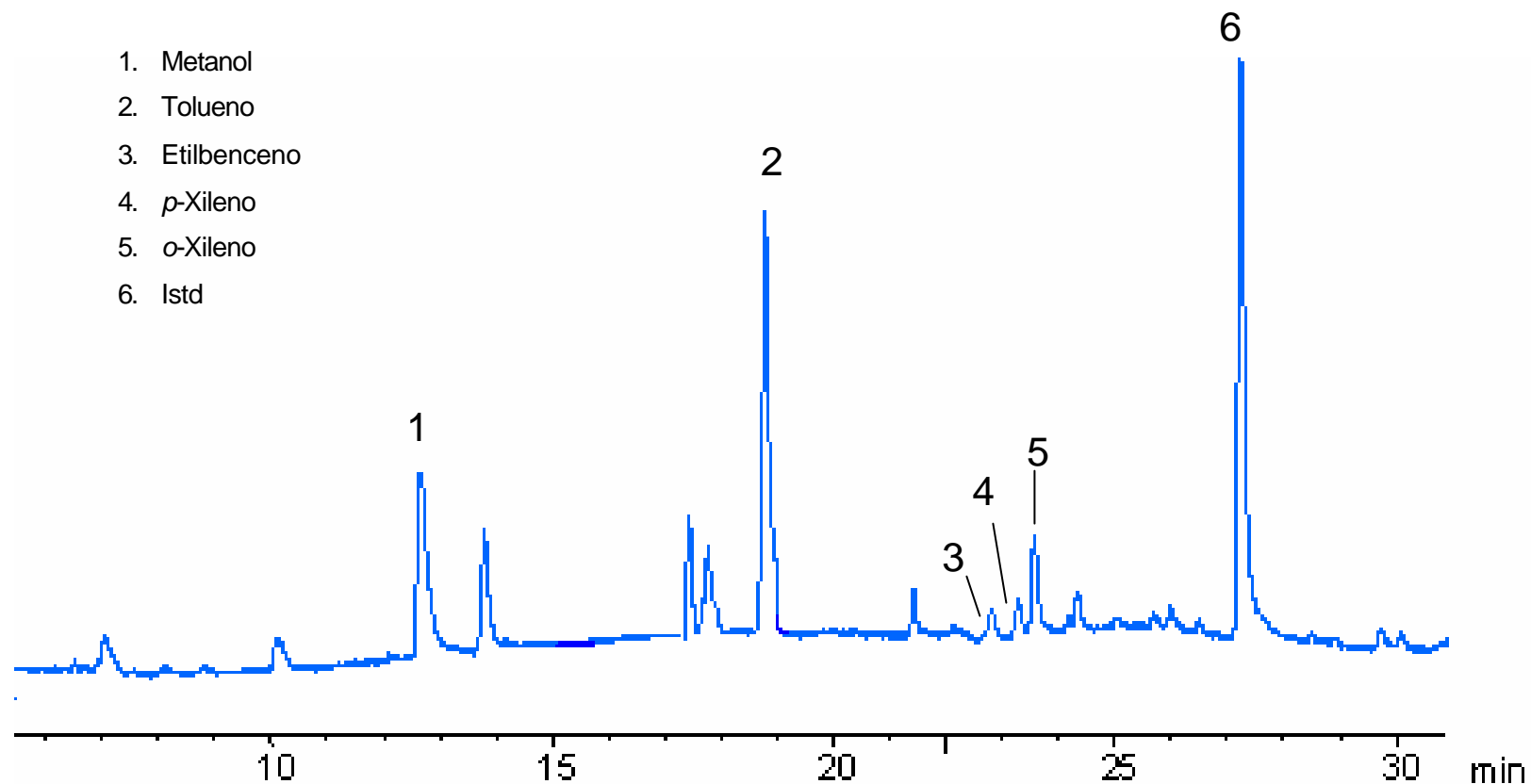


Figura 26. Perfil cromatográfico típico de los compuestos presentes en la fase vapor de una muestra de orina de un trabajador de la fábrica de calzado bajo estudio, aislados por HS-SPME y analizados por HRGC-FID, utilizando una columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52mm (f.e.).

TABLA 21. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de tolueno, etilbenceno y *m*-xileno en muestras de orina de trabajadores de una fábrica de calzado, aislados y cuantificados por HS-SPME/HRGC/FID.

Compuesto	Tolueno, $\mu\text{g/L}$ (Promedio \pm s)		Etilbenceno, $\mu\text{g/L}$ (Promedio \pm s)		<i>m</i> -Xileno, $\mu\text{g/L}$ (Promedio \pm s)		
	Voluntario	8: 00 a.m.	6:30 p.m.	8: 00 a.m.	6:30 p.m.	8: 00 a.m.	6:30 p.m.
1		15.6 \pm 0.8	41.0 \pm 0.5	< 0.5	< 1.0	< 0.5	2.05 \pm 0.09
2		19.6 \pm 0.7	68 \pm 4	2.0 \pm 0.1	1.42 \pm 0.02	< 0.5	2.5 \pm 0.2
3		15.1 \pm 0.4	71 \pm 7	1.28 \pm 0.02	< 1.0	1.17 \pm 0.09	1.5 \pm 0.1
4		17 \pm 1	35.7 \pm 0.7	1.5 \pm 0.1	1.09 \pm 0.03	< 1.0	1.66 \pm 0.07
5		11.0 \pm 0.8	56 \pm 6	< 0.5	1.10 \pm 0.08	< 1.0	1.8 \pm 0.1
6		17 \pm 1	170 \pm 17	< 0.5	< 1.0	< 1.0	< 1.0
7		34 \pm 2	183 \pm 1	1.3 \pm 0.1	< 1.0	< 1.0	< 1.0
8		25 \pm 1	61 \pm 5	1.06 \pm 0.06	< 1.0	2.7 \pm 0.2	1.65 \pm 0.09
9		21 \pm 1	65 \pm 4	< 1.0	< 1.0	< 0.5	1.29 \pm 0.01
10		14.4 \pm 0.3	40 \pm 4	< 1.0	< 1.0	< 0.5	1.8 \pm 0.2
11		20.7 \pm 0.5	80 \pm 7	< 1.0	1.3 \pm 0.1	< 1.0	3.4 \pm 0.3
12		27 \pm 1	93.0 \pm 0.2	< 1.0	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2

Estos resultados no se pueden comparar con los índices de exposición biológica (BEI's) establecidos por la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* [1], puesto que para los compuestos utilizados en el presente estudio, los BEI's reportados en la literatura, corresponden a sus metabolitos (Véase **Tabla 22**). Para el *n*-heptano y ciclohexeno no se han reportado BEI.

TABLA 22. BEI's para algunos hidrocarburos en muestras de orina [1].

Hydrocarburo	Metabolitos utilizado como BEI	Concentración en la orina
<i>n</i> -Hexano	2,5-Hexanodiona	0.4 mg/L
Benceno	Ácido S-fenilmercaptúrico	25 g/g creatinina
Benceno	Ácido <i>trans, trans</i> -mucónico	500 g/g creatinina
Etilbenceno	Ácido mandélico	1.5 g/g creatinina
Xilenos	Ácido metilhipúrico	1.5 g/g creatinina

4.8 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BTEX's E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN EL AIRE, AL INTERIOR DE LA FÁBRICA DE CALZADO.

Siguiendo la metodología descrita en el **Numeral 3.9** se realizó una curva de calibración para la cuantificación y la determinación de los niveles mínimos de detección de los analitos hidrocarbonados en aire. Los resultados se presentan en el **Anexo 10**. Las concentraciones de los compuestos estudiados se registran en la **Tabla 23**. Se observó una notable diferencia entre los muestreos A y B, aunque se realizaron en forma similar, principalmente, para el tolueno, lo cual es aceptable si se tiene en cuenta que los desplazamientos con la sonda al interior de la fábrica no fueron idénticos. Los compuestos bajo estudio presentes en mayor concentración fueron *n*-hexano y tolueno, lo cual coincide con los compuestos mayoritarios encontrados en la fase vapor del pegante "PC-2000" (53.8 % para

tolueno y 8.2 % para *n*-hexano + acetato de etilo). El benceno, ciclohexeno y *n*-heptano no se encontraron por encima de los niveles mínimos de detección.

TABLA 23. Concentración de BTEX's y *n*-hexano en el aire al interior de la fábrica de calzado.

Compuestos	Muestreo A			Muestreo B		
	Concentración, ppmv (n = 2)	s	CV, %	Concentración, ppmv (n = 2)	s	CV, %
<i>n</i> -Hexano	33	2,157	7	29,1	0,467	2
Tolueno	23	1,332	6	13,4	0,322	2
Etilbenceno (<i>p</i> - + <i>m</i> -)	0,665	0,005	0,8	0,77	0,013	2
Xilenos	0,623	0,008	1	0,920	0,005	0,5
<i>o</i> -Xileno	0,477	0,004	0,8	0,534	0,006	1

En la **Tabla 24** se presentan comparaciones de los resultados de los muestreos en aire realizados en el presente estudio con los reportados por Prieto y colaboradores [38] y con los valores máximos permitidos [27]; en la segunda columna aparecen los niveles mínimos de detección de los BTEX's, *n*-hexano, *n*-heptano y ciclohexeno en aire determinados en el presente estudio. La metodología utilizada por Prieto y colaboradores aparece en el **Numeral 2.2.4.1**.

En el estudio por Prieto y colaboradores [38] no se reportó la composición de los pegamentos utilizados al interior de la fábrica de calzado; sin embargo, al comparar los resultados presentados en la **Tabla 24** se encuentra una concordancia entre las concentraciones de tolueno y *n*-hexano en el aire al interior de la fábrica de calzado de España y la de Bucaramanga.

TABLA 24. Niveles mínimos de detección de BTEX's, *n*-hexano, *n*-heptano y ciclohexeno en aire y sus concentraciones, determinadas en el aire al interior de la fábrica de calzado.

Compuesto	NMD (mg/m ³)	Muestreo A (mg/m ³)	Muestreo B. (mg/m ³)	Ref. [38] (mg/m ³)	Valor máximo permitido [27] (mg/m ³)
<i>n</i> -Hexano	2	117	102	113	176
Benceno	1	< 1	< 1	*	32
<i>n</i> -Heptano	2	< 2	< 2	24	1640
Ciclohexeno	3	< 3	< 3	*	1015
Tolueno	2	88	51	80	188
Etilbenceno	2	3	3	*	434
Xilenos	1	7	10	*	434

* No reportado

5. CONCLUSIONES

- Los siguientes son componentes mayoritarios determinados por HS-SPME/HRGC-MSD, en la fase vapor del pegante "PC-2000" (el más utilizado en la fábrica) : tolueno (53.6 %), 2-metil-pentano (9.6 %), *n*-hexano + acetato de etilo (8.2 %), 3-metil-pentano (6.2 %) y 2-metil-hexano + 2,3-dimetil-pentano (6.2 %). La cantidad relativa del *n*-heptano fue del 1 %, el etilbenceno y los xilenos se encontraron en la fase vapor del pegante a nivel de trazas, el benceno y el ciclohexeno no fueron detectados bajo las condiciones experimentales empleadas.
- El análisis por S-HS/HRGC-FID de *n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexeno y los BTEX's en muestras de orina, mostró alta reproducibilidad de los tiempos de retención, t_R (CV = 0.05 – 2 %), t_{RR} (CV = 0.05 – 1 %) y de las áreas, A_i (CV = 1 – 8 %), A_i/A_{Istd} (CV = 0.3 - 9 %), valores que se encuentran dentro de los parámetros recomendados por las Buenas Prácticas de Laboratorio para las técnicas cromatográficas. Para la técnica HS-SPME/HRGC-FID se obtuvieron valores de CV (%) similares, a saber: t_R (0.03 – 1), t_{RR} (0.02 – 0.7), A_i (0.1 – 7) y A_i/A_{Istd} (0.2 - 9).
- Se implementaron las técnicas de extracción SHS y HS-SPME para la determinación de *n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexeno y los BTEX's en muestras de orina. Las condiciones establecidas para S-HS con las cuales, en promedio, se obtuvieron las eficiencias de extracción más altas, fueron: 10 min de termostatación del *vial* a 40 °C; adición de sal al 10 % (p/v); pH de la orina : 7. Para HS-SPME se utilizó un tiempo de exposición de la fibra de 15 min a 22 °C, con la adición de sal al 10 % (p/v) y manteniendo el pH de la orina igual a 7.

- Las 2 técnicas empleadas en este estudio, *i.e.* S-HS y HS-SPME/HRGC-FID, fueron apropiadas analíticamente para la determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en muestras de orina, sin embargo, HS-SPME/HRGC-FID presentó límites de detección en un rango de concentraciones más bajo para el ciclohexeno y los BTEX's (0.5 - 3.0 µg/L) en comparación con la técnica S-HS/HRGC-FID (4.1 - 8.5 µg/L).
- Se estableció la linealidad del método HS-SPME/HRGC-FID para la determinación de *n*-hexano, *n*-heptano, ciclohexeno y los BTEX's en muestras de orina en el intervalo de concentraciones ca. 5 - 300 µg/L; los coeficientes de correlación (R^2) fueron mayores de 0.997.
- La concentración de tolueno en las muestras de orina de los 12 trabajadores de la fábrica de calzado varió al inicio y al término de la jornada laboral en el rango de 11 a 34 µg/L y de 36 a 183 µg/L, respectivamente. La concentración más alta de etilbenceno en orina fue 2 µg/L, para los xilenos 3.4 µg/L; los demás analitos de interés no se encontraron por encima de los niveles mínimos de detección.
- Se implementó y aplicó una metodología, consistente en un sistema de muestreo de aire M18 *VacBag Sampler System* y su posterior análisis por HS-SPME/HRGC-FID, para la determinación de BTEX's, *n*-hexano, *n*-heptano y ciclohexeno en el aire al interior de una fábrica de calzado de Bucaramanga. El *n*-hexano (102 - 117 mg/m³) y el tolueno (51 - 88 mg/m³) fueron los compuestos presentes en mayor concentración.
- Los resultados de esta investigación pueden servir para informar a los trabajadores de la fábrica de calzado sobre el riesgo de la exposición permanente a sustancias como el *n*-hexano y tolueno, y para tomar las medidas necesarias para la manipulación segura de los pegamentos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la aplicación de la metodología implementada para analizar muestras de orina de trabajadores de otras fábricas de calzado de Bucaramanga, con el propósito de obtener resultados estadísticamente representativos y que puedan ser incluidos en las bases de datos de entidades gubernamentales, e.g, del Instituto del Seguro Social.
- Se recomienda la aplicación de la metodología implementada en muestras de orina de trabajadores que a diario manipulan pinturas base solvente y de los trabajadores de las empresas que fabrican resinas y polímeros, ubicadas, principalmente, en Medellín, Antioquia.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2000 TLV's and BEI's. Cincinnati, EE.UU.
2. BARTELT, Robert and ZILKOWSKI, Bruce. Airflow rate in the quantitation of volatiles in air streams by solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, **2000**, 72 (16), p.p. 3949-3955.
3. BRCIC, Irena; SKENDER, Ijiljana. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in urine by purge and trap gas chromatography. *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, p.p. 1225-1229.
4. BURATTI, M; BRAMBILLA, G; FUSTINONI, S; PELEGRINO, O; PULVIREMTI, S, and COLOMBI, A. Determination of monobromobimane derivates of phenylmercapturic and benzylmercapturic acids in urine by HPLC and fluorometry. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 751 (2), p.p. 305-313.
5. CASSARET, Luis and DOULL, James. Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6 ed. McGraw-Hill, New York, 2001. p.p. 225-237, 402, 773, 869-895, 905-912, 1106-1108, 1123-1127.
6. CORDOBA, Darío. Toxicología. 3 ed. Universidad de Antioquia, Colombia, 1996, p.p. 411-412.
7. CURTIS, Claisen y WATKING, John. Toxicología, 5 ed. McGraw-Hill, México, 1988, p.p. 731-733.
8. ELKE, K.; JERMANN, E.; BEGEROW, J., and DUNEMANN, L. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in indoor air at environmental levels using diffusive samplers in combination with headspace solid-phase microextraction and high-resolution gas chromatography-flame ionization detection. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 826 (2), p.p. 191-200.
9. FLÓREZ, J; FERNÁNDEZ, M; SÁNCHEZ, J. Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 415 (1-2), p.p. 9-20.

10. FUSTINONI, S; BURATTI, M; GIAMPICCOLO, R; PULVIRENTI, S., and COLOMBI, A. Biological monitoring of exposure to solvent: a method for the gas chromatographic determination of aromatic hydrocarbons in the blood and urine. *Med. Lav.*, **1996**, 87 (1), p.p. 63 – 75.

11. FUSTINONI, S; BURATTI, M; GIAMPICCOLO, R; PULVIRENTI, S; Foá V., and COLOMBI, A. Comparison between blood and urinary toluene as biomarkers of exposure to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **2000**, 73, p.p. 389– 396.

12. GOODMAN, Alfred; RALL, Theodore, TAYLOR, Palmer y NIES, Alang. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8 ed. Editorial Médica Panamericana, México, 1991, p.p. 1565-1569.

13. HAMILTON, Alice and HARDY, Harriey. Industrial toxicology. 4 ed. Wright, New York, 1983, p.p. 245-253.

14. HANDLEY, Alan. Extraction methods in organic analysis.1 ed. Sheffield Academic Press, Mansion,1999, p.p. 54-62, 75-76, 199-207.

15. HOLM, Torkil. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 842 (1-2), p.p. 221-227.

16. HUNG, I. F.; LEE, S. A. and CHEN, N.K. Simultaneous determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in urine by thermal desorption–gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, **1998**, 706 (2), p.p. 352-357.

17. INOUE, Osmau; KANNO, Etsuko; KAKISAKI, Masaei; WATANABE, Takao; *et. al.* Phenylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to benzene. *Ind. Health.*, **2000**, 38 (2), p.p. 195-204.

18. KOLB, Bruno. Applied Head-Space Gas Chromatography. 1 ed. Heyder, Londres, 1982, p. 185.

19. KONGTIP, P.; VARARUSSAMI, J. and PRUKTHARATHIKUL; V. Modified method for determination of hippuric acid and methylhippuric acid in urine by gas crhomatography. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 751 (1), p.p. 199-203.

20. KOZIEL, Jacek; JIA, Mingyu and PAWLIS ZYN, Janusz. Air sampling with porous solid-phase microextraction fibers. *Anal. Chem.*, **2000**, 72 (21), p.p. 5178-5186.

21. KUBINEC, Robert; BEREZKIN, Victor; GOROVA, Renata; ADDOVÁ, Gabriela; MRACNOVÁ, Helena, and SOJÁK, Ladislav. Needle concentrador for gas chromatographic determination of BTEX's in aqueous simples. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 800 (1-2), p.p. 295-301.
22. KUMAR, Sunil and SINGH, Anita. Biological monitoring of industrial solvent workers exposed to toluene and xylene. *J. Environ. Biol.*, **2000**, 21 (1), p.p. 79-84.
23. LADOW, Josep. Medicina laboral. México: Manual Moderno, 1993, p.p. 486-491.
24. LANGENFELD, John; HAWTHORNE, Steven and MILLER, David. Quantitative analysis of fuel-related hydrocarbons in surface water and wastewater samples by solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, **1996**, 68 (1), p.p. 144-155.
25. LEE, Xiao-pen; KUMAZAWA, Takeshi; KONDO, Kei; FARUTA, Satoshi; *et. al.* Improved extraction of thinner components from human body fluids by headspace solid-microextraction with a carboxen/poly(dimethylsiloxane)-coated fiber. *Leg. Med.*, **1999**, 1 (4), p.p. 231-237.
26. LEWIS, Robert. Lewis Dictionary Toxicology. 1 ed. Lewis Publisher, New York, 1998, p.p.152,153, 476,1038, 1039, 1118, 1119.
27. LIDE, David. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 84 ed, CRC Press, 2003-2004, p 16-43.
28. MANINI, P.; ANDREOLI, R.; BERGAMASCHI, A., and MUTTI, A. Solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine: application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia*, **1999**, 50 (3), p.p. 167-172.
29. Mei-Lien Chen, Shu-Hui Chen, Bey-Rong Guo, and I-Fang Mao. Relationship between environmental exposure to toluene, xylene and ethylbenzene and the expired breath concentrations for gasoline service workers. *J. Environ. Monit.*, **2002**, 4 (4), p.p. 562 – 566.
30. NAM YEE, Kim; SUNG WOO, Park. The comparison of toluene determination between headspace-solid phase microextraction and headspace methods in glue-sniffer's blood and urine samples. *J. Forensic Sci.*, **2000**, 45 (3), 702-707.

31. OEHME, Michael. Practical introduction to GC-MS analysis with quadrupoles. 1 ed. Hüting, Heidelberg, 1998, p.p. 111-112, 115, 125-128.
32. ONG, C.N; KOK, PW; LEE, B. L; SHI, H.Y. Evaluation of biomarkers for occupational exposure to benzene. *Occup. Environ. Med*, **1995**, 52 (3), p.p. 528-533.
33. PAWLISZYN, Janusz. Application of Solid-Phase Microextraction. RSC Chromatography Monographs, Cambridge, 1999, p.p. 4-7, 22, 559-560.
34. PAWLISZYN, Janusz. Theory of Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, **2000**, 38 (7), p.p. 270-277.
35. PERBELLINI, Luigi; PASINI , Francesco; ROMANI, Serena, PRINCIVALLE, Andrea, and BRUGNONE Francesco. Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in biological samples from the general population. *J. Chromatogr. B*, **2002**, 778 (2), p.p. 199-210.
36. PRADO, C; GARRIDO, J and PERIAGO, J. Urinary benzene determination by SPME/GC-MS: A study of variables by fractional factorial design and response surface methodology. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804 (2), p.p. 255-261.
37. PREISBACH, Robert. Manual de toxicología clínica: Prevención, diagnóstico y tratamiento. 6 ed. El Manual Moderno, España, 1988, p.p. 179-181.
38. PRIETO, M; MARHUENDA, D; ROEL, J., and CARDONA, A. Free and total 2,5-hexanedione in biological monitoring of workers exposed to *n*-hexane in the shoe industry. *Toxicol. Lett.*, **2003**, 145 (3), p.p. 249-260.
39. RANDAL, Craig and CREAWEY, Robert. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6 ed. Book Medical Publisher, Chicago, 2002, p.p. 96-98, 404-405, 1041-1045, 1099-1181.
40. Rubiano M., Marciales C., y Duarte M. Evaluación del riesgo ocupacional por exposición a benceno, tolueno y xilenos en una industria de pinturas de Bogotá, D. C. *Revista Colombiana de Química*. **2002**, 31 (1), p.p. 33-43.
41. SANTA, Judith. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. Bucaramanga: 2002, p.p. 13, 48-49. Tesis de Maestría: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

42. SANTA, Judith; SERRANO, Martín y STASHENKO, Elena. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. **2002**, 2 (3), 49-60.
43. SCHREIER, P. Analysis of Volatiles, Methods and Applications. Walter de Gruyter, New York, 1984, p.p. 27-29.
44. SCOTT, Raymond. Chromatographic Detectors. 1 Ed. Marcel Dekker, New York, 1996, p.p. 99-100, 103-104.
45. THOMAS, Stiven; RANJAN, Ramanathan; WEBSTER, Barrie, and SARNA, Leonard. Protocol for the analysis of high concentrations of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers in water using automated solid-phase microextraction-GC-FID. *Environ. Sci. Technol.*, **1996**, 30 (5), p.p. 1521-1526.
46. WILSON, Michael and BUFFINGTON, Rosemary. Detectors for gas chromatography: A practical primer. Hewlett-Packard, 1987, p.p. 27-28.
47. YANG, Ji-won; KITAE, Baek ; LEE, Hyun-Ho ; LEE, Sang-Hyun; CHO, Hyun-Jeon; *et. al.* Competitive extraction of multicomponents contaminants in water by carboxen-polydimethylsiloxane fiber during solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 988 (2), p.p. 177-184.
48. YESHVANDRA, V. and RANA, S. Biological monitoring of exposure to toluene in Indian shoe markers. *J. Ecophys. Occup. Health*, **2002**, 2 (1), p.p.127-134,2002.
49. XIAO, G; PAN, C; CAI, Y; LIN, H., and FU, Z. Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality of exposed workers. *Chin Med J.*, **1999**, 112, p.p. 709-712.

ANEXOS

ANEXO 1

**ENCUESTA REALIZADA A LOS 12 TRABAJADORES QUE
SUMINISTRARON LAS MUESTRAS DE ORINA.**

Anexo 1.1. Encuesta realizada a los 12 trabajadores que suministraron las muestras de orina

Información Personal

Nombre(s): _____ Apellidos: _____

Edad: _____ Masa corporal : _____

¿Ingiere bebidas alcohólicas? Sí ___ No ___ Frecuencia : _____.

Enfermedades que padece (opcional):

Dolor de cabeza: Sí ___ No ___ Mareo: Sí ___ No ___

Debilidad: Sí ___ No ___ Depresión: Sí ___ No ___

Otras: _____

Información laboral

Labor(es) que desempeña dentro de la fábrica: Diseño ___ Cortado ___
Pegado ___ Soladura ___ Guarnición ___ Terminado ___ Otros ___

Tiempo que ha laborado en la manufactura de calzado: 1 año ___ 2 años ___

3 años ___ 3-5 años ___ 5-8 años ___ 8-15 años ___ más de 15 años ___.

Horas de trabajo/día: _____ Horas de trabajo semana: _____.

Pegantes y limpiadores que utiliza con más frecuencia: "PC-2000" ___

"Maxón" ___ "Caucho Sol" ___ "Kisaffix" ___ "Varsol" ___ "Caucho Luna" ___

Anexo 1.2. Resultados de la encuesta realizada a los 12 trabajadores que suministraron las muestras de orina.

Voluntario	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Edad, años	31	23	21	18	26	19	26	20	24	25	22	20
Masa corporal, kg	70	69	62	55	N.D.	54	60	49	N.D.	N.D.	57	N.D.
Número de veces al mes que ingiere bebidas alcohólicas	1	1	2	1	2	1	1	4	1	2	2	1
Dolor de cabeza	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí
Mareo	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Debilidad	No	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Depresión	No	No	No	No	Sí	No	Sí	Sí	No	No	No	Sí
Estrés	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
Dolor de ojos	No	Sí	Sí	No	No	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí
Labor dentro de la fábrica ^a	Peg.	Sol.	Peg.	Peg.	Peg.	Sol.	Ter.	Sol.	Sol.	Peg.	Peg.	Peg.
Tiempo que ha laborado, años	3	7	2	3	4	3	2	3	1	3	2	2
Horas de trabajo/día	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Horas de trabajo por semana	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Pegante o limpiador utilizado con más frecuencia	"PC-2000"	"PC-2000"	"PC-2000"	"PU Rápido"	"PC-2000"	"PU Rápido"	"PC-2000"	"PC-2000"	"PC-2000"	"PU Rápido"	"PC-2000"	"PC-2000"
Utilización de máscara de respiración	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

N.D. = No disponible

a. (Peg. = pegado, Sol. = soldadura, Ter. = terminado)

Anexo 1.3. Resultados de la encuesta realizada a los 12 trabajadores que suministraron las muestras de orina, expresados como promedios o porcentajes.

1. Edad, promedio = 23 años.
2. Masa corporal, promedio = 60 kg.
3. Ingestión de bebidas alcohólicas/mes = 1 Vez (58 %); 2 veces (34 %); 3 veces (8 %).
4. Enfermedades que padece:

	Sí, %	No, %
Dolor de cabeza	58	42
Mareo	0	100
Debilidad	42	58
Depresión	33	67
Estrés	67	33
Dolor de ojos	58	42

5. Labor dentro de la fábrica: Pegado (58 %); Soladura (34 %); Terminado (8 %).
6. Tiempo que ha laborado en la manufactura de calzado: 1 año (8 %); 2 años (34 %); 3 años (42 %); 4 años (8 %); 7 años (8 %).
7. Horas de trabajo/día, promedio = 10.
8. Horas de trabajo por semana, promedio = 50.
9. Pegante o limpiador utilizado con más frecuencia: "PC-2000" (75 %); "PU Rápido" (25 %).
- 10 Utilización de máscara de respiración: No (100 %): ninguno utiliza la máscara.

ANEXO 2

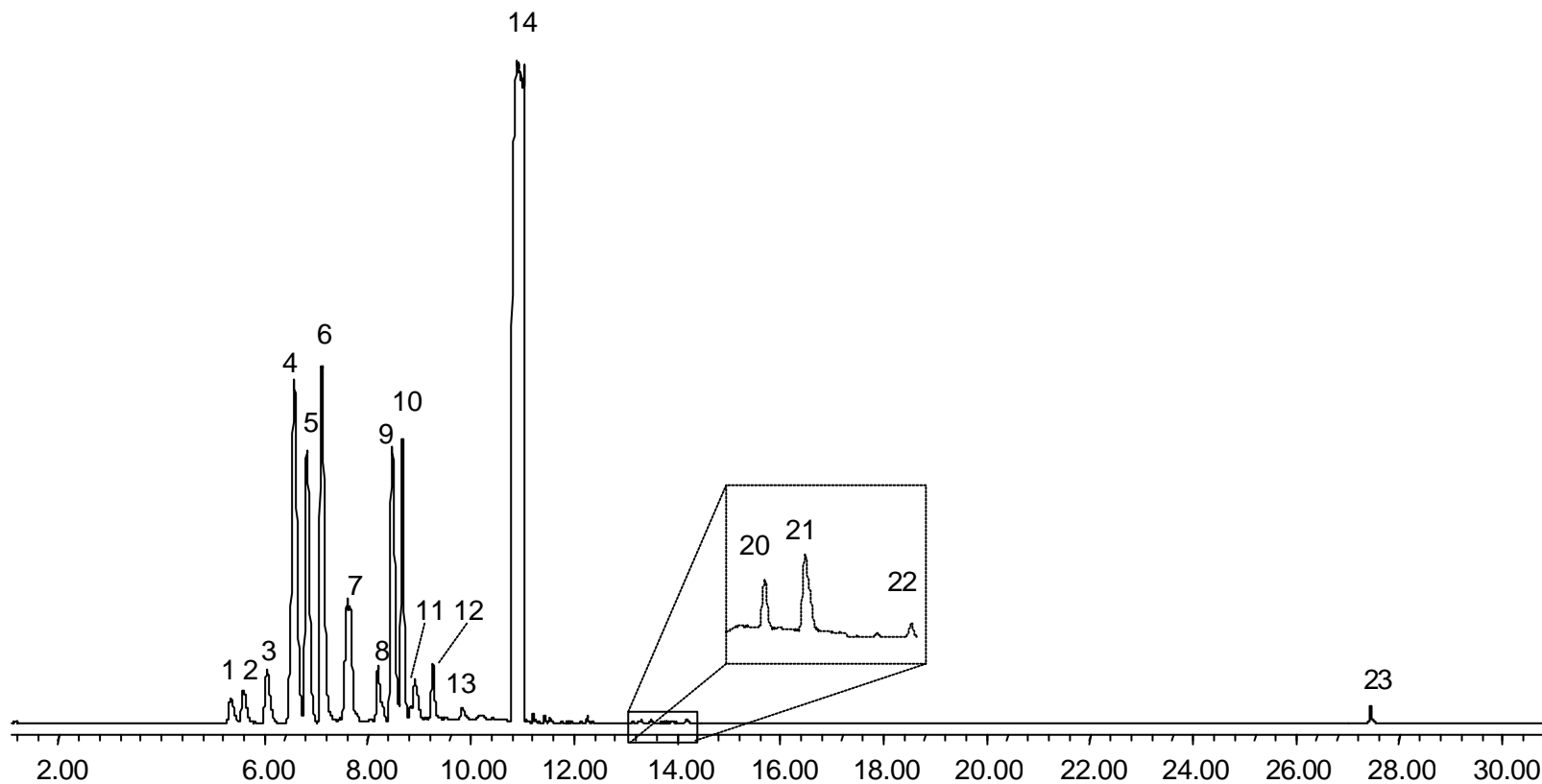
**COMPUESTOS PRESENTES EN EL *HEADSPACE* DEL PEGANTE “PC-2000”,
ANALIZADOS POR HS-SPME/GC-MS.**

Anexo 2.1. Composición química de la fase vapor del pegante “PC-2000” analizada por HS-SPME/GC-MS.

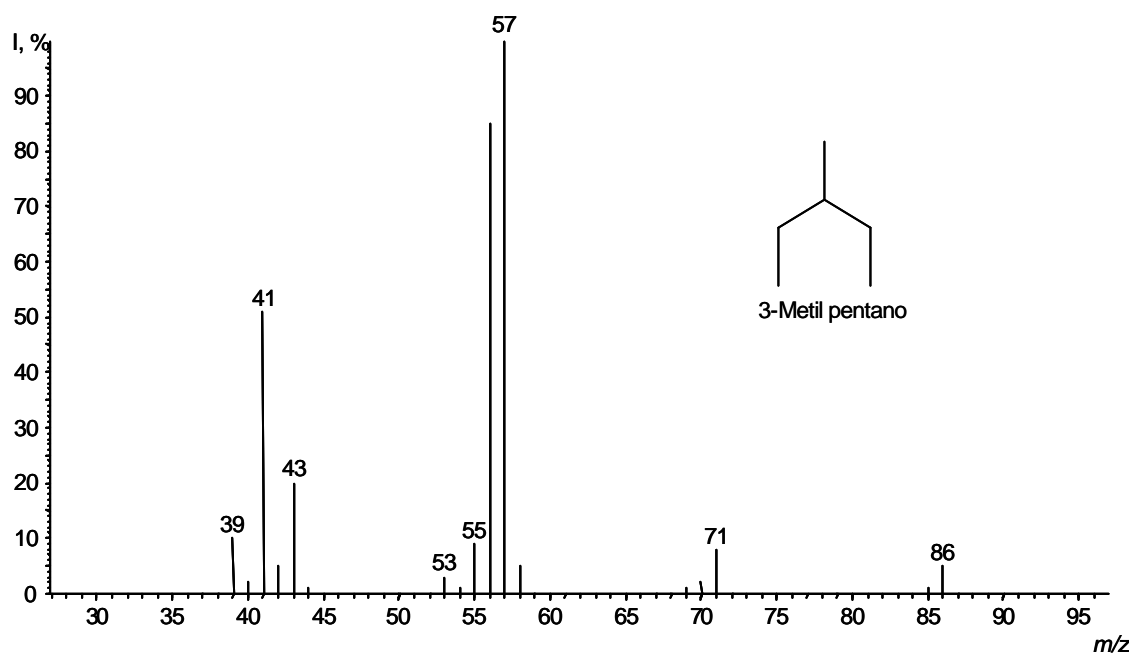
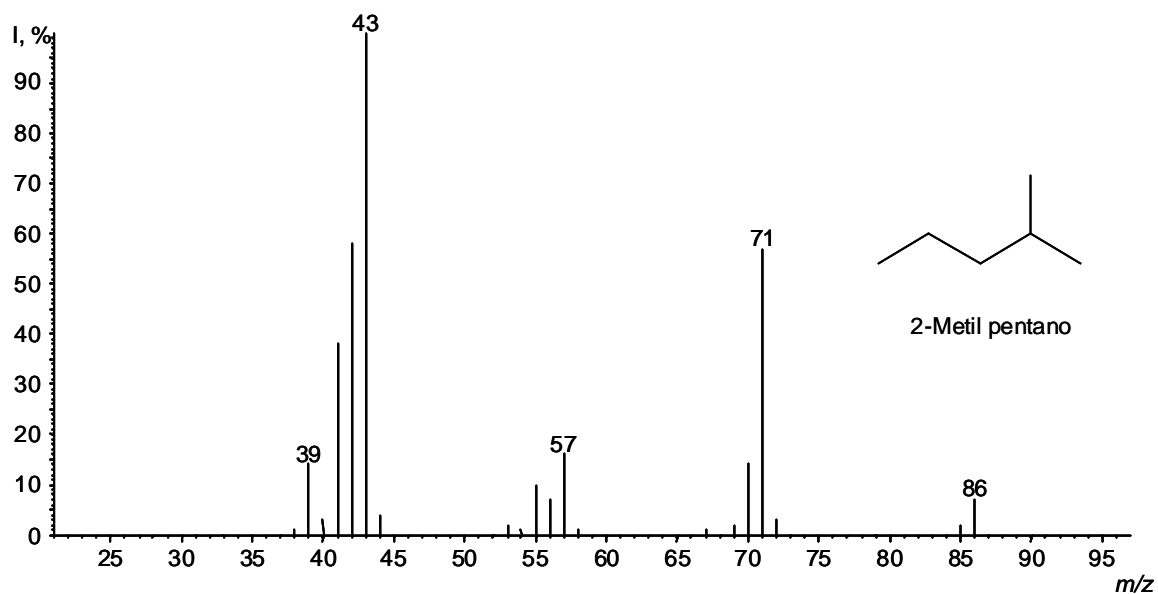
No. Pico	t_R, min	Compuestos	Cantidad relativa**, %
1	5.34	2-Metil-butano	0.7
2	5.59	<i>n</i> -Pentano	0.9
3	6.05	2,2-Dimetil-butano	1.4
4	6.58	2-Metil-pentano	9.6
5	6.82	3-Metil-pentano	6.2
6	7.11	<i>n</i>-Hexano + Acetato de etilo	8.2
7	7.61	Metil-ciclopentano + 2,2-Dimetil-pentano + 2,4-Dimetil pentano	4.5
8	8.19	3,3-Dimetil-pentano + Ciclohexano	1.2
9	8.47	2-Metil-hexano + 2,3-Dimetil-pentano	6.2
10	8.67	3-Metil-hexano	4.5
11	8.91	1,3-Dimetil-ciclopentano + 3-Etil-pentano* +1,2-Dimetil-ciclopentano	1.2
12	9.26	<i>n</i> -Heptano	1.0
13	9.84	Metil-ciclohexano	0.2
14	10.90	Tolueno	53.6
15	11.20	2-Metil-heptano	0.08
16	11.43	3-Metil-heptano	0.06
17	11.53	1,3-Dimetil-ciclohexano	0.07
18	12.26	<i>n</i> -Octano	0.05
19	13.30	Etil-ciclohexano	tr
20	13.89	Etilbenceno	tr
21	14.18	(<i>m</i> - + <i>p</i> -) Xilenos	tr
22	14.95	<i>o</i> -Xileno	0.07
23	27.45	<i>m-ter</i> -Butil fenol	0.2

* Identificado tentativamente

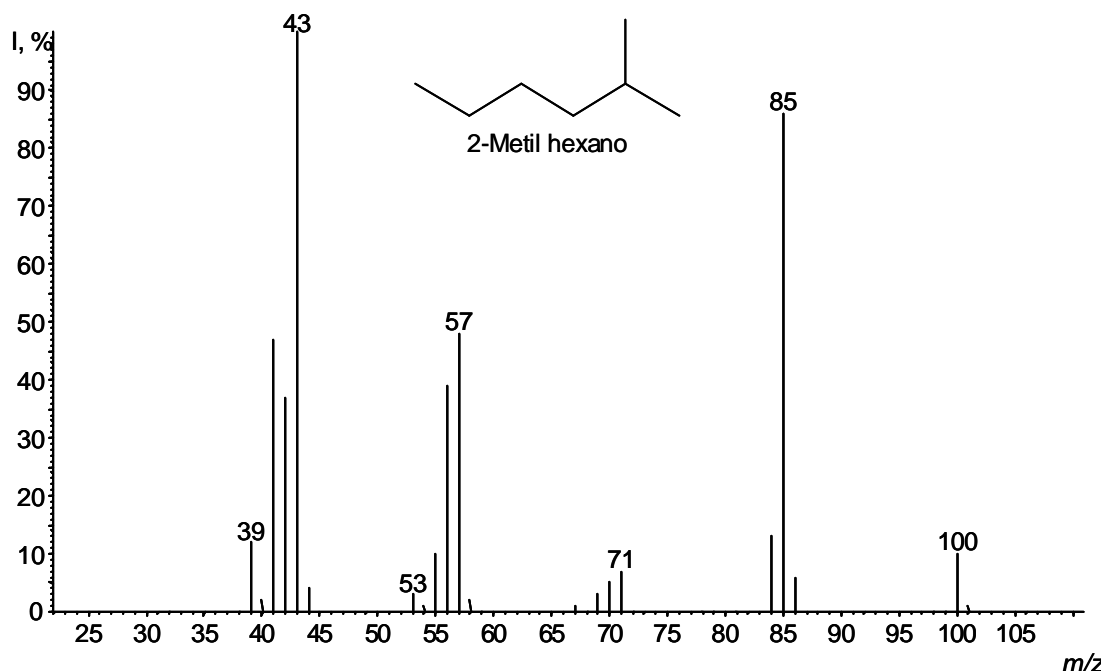
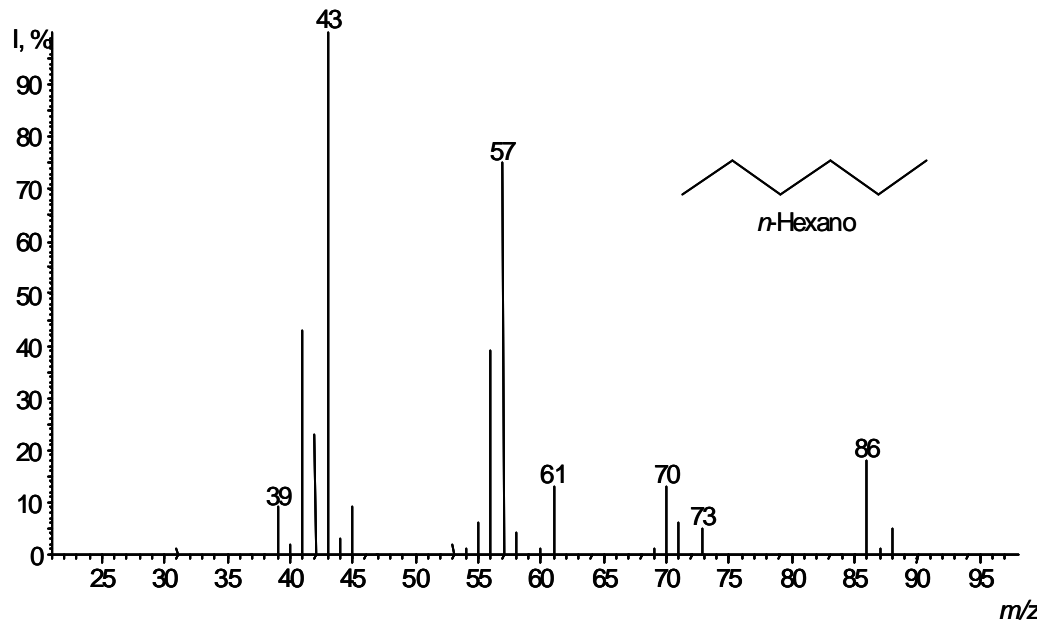
** Áreas GC relativas renormalizadas



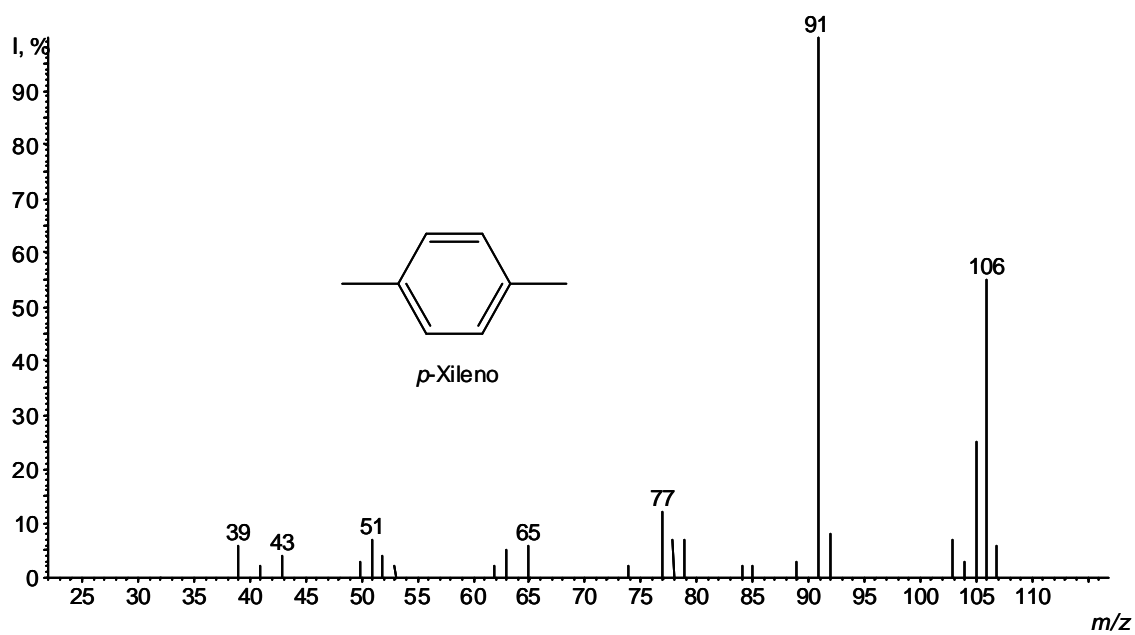
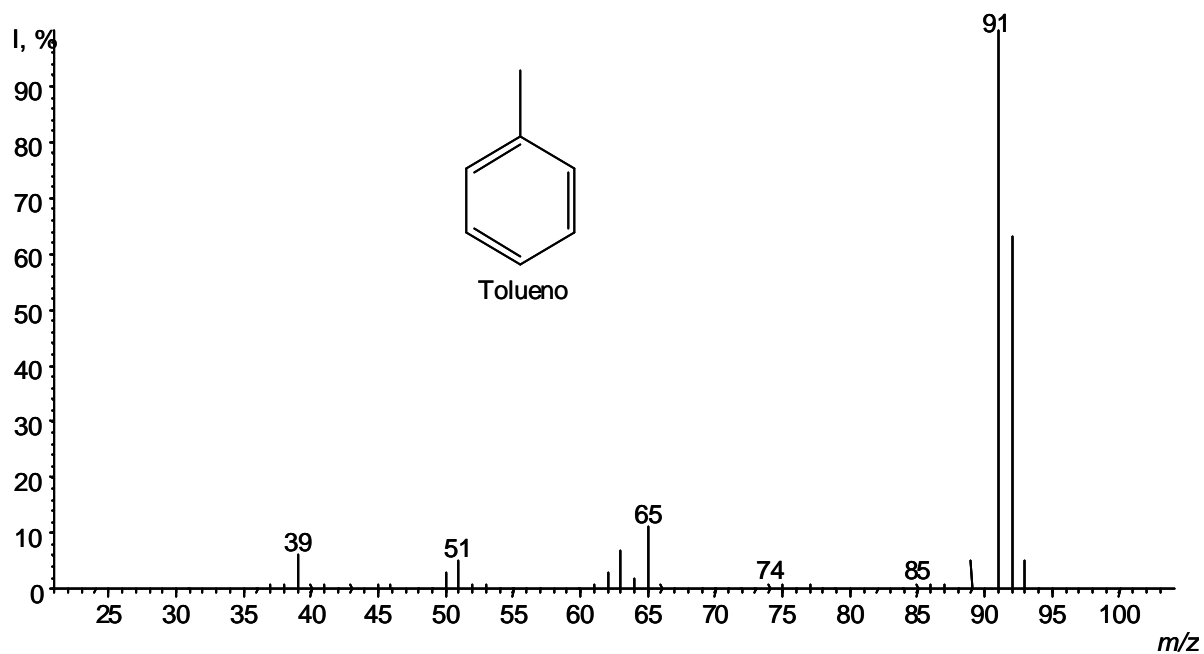
Anexo 2.2. Corriente iónica total reconstruída (cromatograma) de la fase vapor del pegante “PC-2000”, obtenida por HS-SPME/GC-MS, utilizando una fibra de PDMS (100 μ m) y una columna capilar DB-1MS, [poli(dimetilsiloxano)], 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 mm (f.e.).



Anexo 2.3. Espectros de masas (EI, 69.9 eV) del 2metil-pentano y del 3-metil-pentano.



Anexo 2.4. Espectros de masas (EI, 69.9 eV) del *n*-hexano y del 2metilhexano.



Anexo 2.4. Espectros de masas (EI, 69.9 eV) del tolueno y del *p*-xileno.

ANEXO 3

**ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN
ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LOS BTEX'S E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS
VOLÁTILES, AISLADOS POR S-HS (ISTD = CLOROBENCENO).**

Anexo 3.1. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *n*-hexano, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
10	7,5	27.8	0,269	0,05	0.00037	0,00121	0,7	0.001	0,4
16	7,5	27.7	0,2694	0,02	0.48908	0,00025	0,2	1.8	0,09
33	7,4	27.6	0,269	0,1	0.10621	0,00290	1.0	0.4	1.0
50	7,4	27.6	0,269	0,1	0.11752	0,00261	1.0	0.4	1.0
330	7,5	27.6	0,270	0,1	0.10941	0,00264	1.0	0.4	1.0
495	7,5	27.7	0,269	0,2	0.42062	0,00328	2.0	1.5	1.0

Anexo 3.2. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del benceno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
7	8,4	0.3	0,302	0,004	0.00128	0,00077	0,05	0.4	0,3
10	8,4	27.8	0,300	0,06	0.00037	0,00128	0,8	0.001	0,4
16	8,3	27.7	0,300	0,02	0.48908	0,00027	0,3	1.8	0,1
32	8,3	27.6	0,299	0,1	0.10621	0,00307	1.0	0.4	1.0
48	8,3	27.6	0,300	0,1	0.11752	0,00277	1.0	0.4	0,9
322	8,3	27.6	0,300	0,1	0.10941	0,00265	1.0	0.4	0,9
483	8,3	27.7	0,300	0,2	0.42062	0,00322	2.0	1.5	1.0

Anexo 3.3. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del ciclohexeno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
9	10,45	27,74	0,3767	0,01	0,06	0,00059	0,05	0,2	0,2
12	10,45	27,8	0,376	0,09	0,2	0,00136	0,9	0,6	0,4
20	10,39	27,69	0,3753	0,03	0,08	0,00030	0,3	0,3	0,1
40	10,4	27,7	0,374	0,1	0,1	0,00276	1,0	0,4	0,7
61	10,4	27,6	0,375	0,1	0,1	0,00256	1,0	0,4	0,7
202	10,4	27,6	0,375	0,1	0,1	0,00257	1,0	0,4	0,7
405	10,4	27,7	0,375	0,2	0,4	0,00381	2,0	2,0	1,0

Anexo 3.4. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *n*-heptano, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
10	15,1	27,8	0,543	0,1	0,2	0,00170	0,9	0,6	0,3
17	15,03	27,69	0,5428	0,05	0,08	0,00034	0,3	0,3	0,06
34	15,0	27,7	0,542	0,1	0,1	0,00207	0,8	0,4	0,38
51	15,0	27,6	0,542	0,1	0,1	0,00206	0,8	0,4	0,38
257	15,0	27,6	0,543	0,3	0,1	0,00192	2,0	0,4	0,35
513	14,8	27,7	0,543	0,3	0,4	0,00361	2,0	2,0	0,66

Anexo 3.5. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del etilbenceno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
7	23,04	27,74	0,8305	0,06	0,06	0,00063	0,3	0,2	0,08
10	23,04	27,8	0,831	0,09	0,2	0,00113	0,4	0,6	0,1
17	22,98	27,69	0,8298	0,08	0,08	0,00051	0,3	0,3	0,06
35	22,9	27,7	0,830	0,1	0,1	0,00144	0,6	0,4	0,2
52	22,9	27,6	0,830	0,1	0,1	0,00125	0,6	0,4	0,2
260	23,0	27,6	0,8302	0,1	0,1	0,00094	0,5	0,4	0,1
512	23,07	27,787	0,829	0,04	0,001	0,00274	0,2	0,005	0,3

Anexo 3.6. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos para el p-xileno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
7	26,25	27,74	0,9463	0,08	0,06	0,00093	0,3	0,2	0,1
10	26,4	27,8	0,947	0,2	0,2	0,00185	0,8	0,6	0,2
16	26,2	27,69	0,9458	0,1	0,08	0,00086	0,4	0,3	0,09
35	26,1	27,7	0,945	0,1	0,1	0,00136	0,5	0,4	0,1
52	26,1	27,6	0,945	0,2	0,1	0,00146	0,6	0,4	0,2
260	26,1	27,6	0,946	0,1	0,1	0,00134	0,5	0,4	0,1
512	26,2	27,7	0,946	0,5	0,4	0,00420	2,0	2,0	0,4

Anexo 3.7. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *m*-xileno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
10	23,9	27,8	0,859	0,2	0,2	0,00190	0,8	0,6	0,2
17	23,75	27,69	0,8579	0,08	0,08	0,00057	0,3	0,3	0,1
35	23,7	27,7	0,857	0,1	0,1	0,00135	0,5	0,4	0,2
52	23,7	27,6	0,858	0,1	0,1	0,00128	0,6	0,4	0,1
261	23,8	27,6	0,858	0,5	0,1	0,00102	2	0,4	0,1
521	23,5	27,7	0,859	0,4	0,4	0,00340	2	2	0,4

Anexo 3.8. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *o*-xileno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
7	23,49	27,74	0,8467	0,07	0,06	0,00082	0,3	0,2	0,1
10	23,6	27,8	0,848	0,2	0,2	0,00184	0,8	0,6	0,2
32	23,43	27,69	0,8462	0,08	0,08	0,00055	0,3	0,3	0,06
48	23,4	27,7	0,846	0,1	0,1	0,00139	0,5	0,4	0,2
242	23,4	27,6	0,8464	0,1	0,1	0,00096	0,5	0,4	0,1
484	23,4	27,7	0,847	0,4	0,4	0,00323	2,0	2,0	0,4

ANEXO 4

ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LOS BTEX'S E HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS VOLÁTILES, AISLADOS POR HS-SPME (ISTD = CLOROBENCENO).

Anexo 4.1. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *n*-hexano, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
10	7,09	27,69	0,2557	0,07	0,09	0,00071	1,0	0,3	0,2
25	7,10	27,706	0,256	0,02	0,004	0,00179	0,3	0,01	0,7
50	7,02	27,760	0,2562	0,03	0,007	0,00082	0,4	0,03	0,3
74	7,17	27,7	0,2235	0,05	0,1	0,00056	0,7	0,3	0,3
99	7,09	27,71	0,256	0,02	0,04	0,00150	0,3	0,2	0,6
297	7,09	27,7	0,256	0,06	0,10	0,00135	0,8	0,3	0,5

Anexo 4.2. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del benceno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
5	7,94	27,67	0,286	0,04	0,04	0,0052	0,5	0,2	0,3
10	7,95	27,69	0,2871	0,08	0,09	0,00065	1,0	0,3	0,2
24	7,95	27,706	0,287	0,02	0,004	0,00192	0,2	0,01	0,7
48	7,94	27,760	0,2868	0,05	0,007	0,00061	0,7	0,03	0,2
72	7,02	27,7	0,2517	0,04	0,1	0,00091	0,6	0,3	0,2
97	7,17	27,71	0,287	0,07	0,04	0,00158	0,9	0,2	0,6
290	7,97	27,7	0,287	0,08	0,10	0,00117	1,0	0,3	0,4

Anexo 4.3. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del ciclohexeno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
12	10,07	27,69	0,3641	0,03	0,09	0,00044	0,3	0,3	0,08
30	10,1	27,706	0,364	0,10	0,004	0,00229	1,0	0,01	0,6
61	10,09	27,760	0,3640	0,02	0,007	0,00062	0,2	0,03	0,2
91	9,99	27,7	0,3256	0,02	0,1	0,00089	0,2	0,3	0,2
121	10,18	27,71	0,365	0,09	0,04	0,00179	0,8	0,2	0,5
364	10,07	27,7	0,364	0,07	0,10	0,00135	0,7	0,3	0,4

Anexo 4.4. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *n*-heptano, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
26	14,9	27,71	0,5365	0,10	0,09	0,00039	0,7	0,01	0,06
51	14,87	27,760	0,537	0,02	0,004	0,00171	0,1	0,03	0,3
77	14,76	27,7	0,5368	0,06	0,007	0,00057	0,4	0,3	0,1
103	14,95	27,71	0,537	0,07	0,1	0,00104	0,5	0,2	0,1
307	14,9	27,71	0,537	0,1	0,04	0,00130	0,8	0,3	0,2

Anexo 4.5. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del etilbenceno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
5	22,94	27,67	0,8289	0,05	0,04	0,00049	0,2	0,2	0,06
10	22,95	27,69	0,8290	0,08	0,09	0,00044	0,3	0,3	0,05
26	22,972	27,706	0,8288	0,008	0,004	0,00069	0,03	0,01	0,08
52	22,98	27,760	0,8291	0,05	0,007	0,00016	0,2	0,03	0,02
78	22,96	27,7	0,8181	0,08	0,1	0,00058	0,4	0,3	0,02
104	22,99	27,71	0,8286	0,09	0,04	0,00041	0,4	0,2	0,05
312	22,99	27,71	0,8290	0,06	0,10	0,00026	0,3	0,3	0,03

Anexo 4.6. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del p-xileno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
5	23,40	27,67	0,8452	0,05	0,04	0,00027	0,2	0,2	0,03
9	23,40	27,69	0,8455	0,09	0,09	0,00039	0,4	0,3	0,05
24	23,431	27,706	0,8453	0,008	0,004	0,00068	0,03	0,01	0,08
47	23,43	27,760	0,8457	0,07	0,007	0,00018	0,3	0,03	0,02
71	23,46	27,7	0,8343	0,04	0,10	0,00017	0,2	0,3	0,02
98	23,45	27,71	0,8452	0,05	0,04	0,00028	0,2	0,2	0,03
284	23,44	27,7	0,8454	0,01	0,10	0,00055	0,1	0,3	0,07

Anexo 4.7. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *m*-xileno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
5	23,72	27,67	0,8572	0,01	0,04	0,00054	0,2	0,2	0,06
10	23,7	27,69	0,8573	0,1	0,09	0,00041	0,4	0,3	0,04
26	23,756	27,706	0,8571	0,008	0,004	0,00060	0,03	0,01	0,07
52	23,74	27,760	0,8574	0,06	0,007	0,00016	0,2	0,03	0,02
78	23,67	27,7	0,8453	0,08	0,1	0,00014	0,3	0,3	0,02
104	23,76	27,71	0,8570	0,06	0,04	0,00025	0,3	0,2	0,03
312	23,77	27,7	0,8572	0,01	0,10	0,00040	0,1	0,3	0,05

Anexo 4.8. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención absolutos y relativos del *o*-xileno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	\bar{t}_R , min (n = 3)	\bar{t}_{istd} , min (n = 3)	\bar{t}_{RR} (n = 3)	s			CV, %		
				\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}	\bar{t}_R	\bar{t}_{istd}	\bar{t}_{RR}
5	26,2	27,67	0,9452	0,1	0,04	0,00039	0,4	0,2	0,03
10	26,196	27,69	0,9453	0,009	0,09	0,00036	0,04	0,3	0,03
24	26,16	27,706	0,9453	0,05	0,004	0,00065	0,2	0,01	0,07
48	26,19	27,760	0,9455	0,06	0,007	0,00020	0,2	0,03	0,02
73	26,2	27,7	0,9263	0,1	0,1	0,00014	0,4	0,3	0,02
97	26,24	27,71	0,9452	0,03	0,04	0,00026	0,1	0,2	0,03
290	26,22	27,7	0,9452	0,04	0,10	0,00059	0,1	0,3	0,06

ANEXO 5

**ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE ÁREAS CROMATOGRÁFICAS DE LOS BTEX's E
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS VOLÁTILES, AISLADOS POR S-HS.**

Anexo 5.1. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *n*-hexano, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	236	3840	0,061	4	97	0,0025	2.0	3.0	4.0
16	430	3910	0,111	14	57	0,0051	3.0	1.0	5.0
33	990	3890	0,255	21	58	0,0090	2.0	1.0	4.0
50	1480	3840	0,39	44	95	0,0130	3.0	2.0	3.0
330	5920	3760	1,58	95	68	0,0362	2.0	2.0	2.0
495	8520	3830	2,23	97	73	0,0626	1.0	2.0	3.0

Anexo 5.2. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del benceno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	260	3840	0,068	16	97	0,0060	6.0	3.0	9.0
16	760	3910	0,19	29	57	0,0101	4.0	1.0	5.0
32	2310	3890	0,59	22	58	0,0137	1.0	1.0	2.0
48	3390	3840	0,88	22	95	0,0173	1.0	2.0	2.0
322	12700	3760	3,38	133	68	0,0355	1.0	2.0	1.0

Anexo 5.3. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del ciclohexeno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
20	869	3907	0.222	16	57	0.0053	2.0	1.0	2.0
40	2387	3892	0.61	14	58	0.0092	1.0	1.0	2.0
61	3580	3842	0.93	24	95	0.0288	1.0	2.0	3.0
202	7952	3757	2.12	130	68	0.0734	2.0	2.0	3.0
405	13416	3832	3.50	157	73	0.1047	1.0	2.0	3.0

Anexo 5.4. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *n*-heptano, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
34	1520	3890	0.389	51	57	0.0097	3.0	1.0	3.0
51	2610	3840	0.67	92	58	0.0225	4.0	2.0	3.0
257	13370	3760	3.56	459	68	0.0120	3.0	2.0	3.0
513	20370	3830	5.32	863	73	0.0201	4.0	2.0	3.0

Anexo 5.5. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del etilbenceno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	450	3840	0,117	30	97	0,0068	7.0	3.0	6.0
17	810	3910	0,207	19	57	0,0033	2.0	1.0	2.0
35	2470	3890	0,635	45	58	0,0047	2.0	1.0	1.0
52	4430	3840	1,15	83	95	0,0500	2.0	2.0	4.0
260	25000	3760	6,7	157	68	0,1616	1.0	2.0	2.0

Anexo 5.6. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *p*-xileno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	360	3840	0.094	14	97	0.0039	4.0	3.0	4.0
17	820	3910	0.211	13	57	0.0015	2.0	1.0	1.0
35	1790	3890	0.46	59	58	0.0180	3.0	1.0	4.0
52	3600	3840	0.94	109	95	0.0219	3.0	2.0	2.0
260	20800	3760	5.55	605	68	0.0620	3.0	2.0	1.0
512	37900	3830	9.887	953	73	0.4210	3.0	2.0	4.0

Anexo 5.7. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *m*-xileno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	340	3840	0,088	25	97	0,0055	8.0	2.0	6.0
17	1140	3910	0,29	62	57	0,0159	5.0	2.0	5.0
35	1760	3890	0,45	62	58	0,0174	3.0	2.0	4.0
52	3600	3840	0,94	108	95	0,0179	3.0	2.0	2.0
261	20800	3760	5.55	321	68	0.0190	2.0	2.0	0.3
521	40000	3830	5.4	1752	73	0.1773	4.0	2.0	3.0

Anexo 5.8. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *o*-xileno, aislado por S-HS (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	340	3840	0.089	20	97	0.0076	6.0	3.0	8.0
16	940	3910	0.24	45	57	0.0135	5.0	1.0	6.0
32	1420	3890	0.36	57	58	0.0194	4.0	1.0	5.0
48	2730	3840	0.711	88	95	0.0062	3.0	2.0	1.0
242	15100	3760	4.0	362	68	0.0385	2.0	2.0	1.0
484	29400	3830	3.9	528	73	0.1684	2.0	2.0	4.0

ANEXO 6

**ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LAS ÁREAS CROMATOGRÁFICAS DE LOS BTEX's E
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS VOLÁTILES, AISLADOS POR HS-SPME.**

Anexo 6.1. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *n*-hexano, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
10	500	3910	0,129	20	57	0,006	4	2	5
25	1300	3890	0,34	79	58	0,023	6	2	7
50	2200	3840	0,57	139	95	0,049	6	2	9
74	3500	3760	0,94	173	68	0,063	5	2	7
99	4400	3830	1,16	165	73	0,065	4	2	6
297	11300	3532	3,21	280	100	0,043	2	3	1

Anexo 6.2. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del benceno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
5	550	3840	0,143	25	97	0,006	5	3	4
10	1130	3910	0,29	55	57	0,015	5	2	5
24	2910	3890	0,75	39	58	0,021	1	2	3
48	5800	3840	1,52	205	95	0,080	4	2	5
72	8200	3760	2,17	211	68	0,034	3	2	2
97	11800	3830	3,1	362	73	0,152	3	2	5
290	32000	3500	9,1	1533	100	0,217	5	2	2

Anexo 6.3. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del ciclohexeno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
12	820	3910	0,21	48	57	0,011	6	2	5
30	2140	3890	0,55	65	58	0,025	3	2	5
61	4250	3840	1,11	207	95	0,071	5	2	6
91	5900	3760	1,56	317	68	0,059	5	2	4
121	8300	3830	2,2	281	73	0,114	3	2	5
364	23400	3500	6,6	635	100	0,114	3	3	2

Anexo 6.4. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *n*-heptano, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
26	790	3890	0,20	44	58	0,014	6	2	7
51	1600	3840	0,42	103	95	0,036	6	2	9
77	2100	3760	0,57	121	68	0,023	6	2	4
103	3040	3830	0,79	83	73	0,036	3	2	5
307	8780	3500	2,49	10	100	0,097	0,1	3	4

Anexo 6.5. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del etilbenceno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
5	1050	3840	0,274	36	97	0,002	3	3	1
9	2180	3910	0,56	76	57	0,011	3	2	2
24	5400	3890	1,38	116	58	0,050	2	2	4
47	11900	3840	3,1	325	95	0,105	3	2	3
71	15900	3760	4,2	721	68	0,117	5	2	3
98	22800	3830	5,95	400	73	0,014	2	2	0,2
284	64000	3500	18,0	1037	100	0,727	2	2	4

Anexo 6.6. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del p-xileno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
5	1370	3840	0,357	10	97	0,007	1	3	2
10	2500	3910	0,65	133	57	0,025	5	2	4
26	5700	3890	1,47	120	58	0,045	2	2	3
52	13200	3840	3,4	984	95	0,189	7	2	6
78	15800	3760	4,2	670	68	0,110	4	2	3
104	24700	3830	6,4	594	73	0,254	2	2	4
312	70000	3500	19,9	1450	100	0,164	2	3	1

Anexo 6.7. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *m*-xileno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
5	1140	3840	0,066	49	97	0,004	4	3	6
10	2450	3910	0,29	69	57	0,014	3	2	5
24	5700	3890	0,63	180	58	0,010	3	2	2
48	12600	3840	1,50	645	95	0,042	5	2	3
73	16300	3760	3,3	571	68	0,195	4	2	6
97	23000	3830	4,3	581	73	0,210	3	2	5
290	68000	3500	6,5	1083	100	0,215	2	3	3

Anexo 6.8. Estudio de la reproducibilidad de áreas cromatográficas del *o*-xileno, aislado por HS-SPME (Istd = clorobenceno).

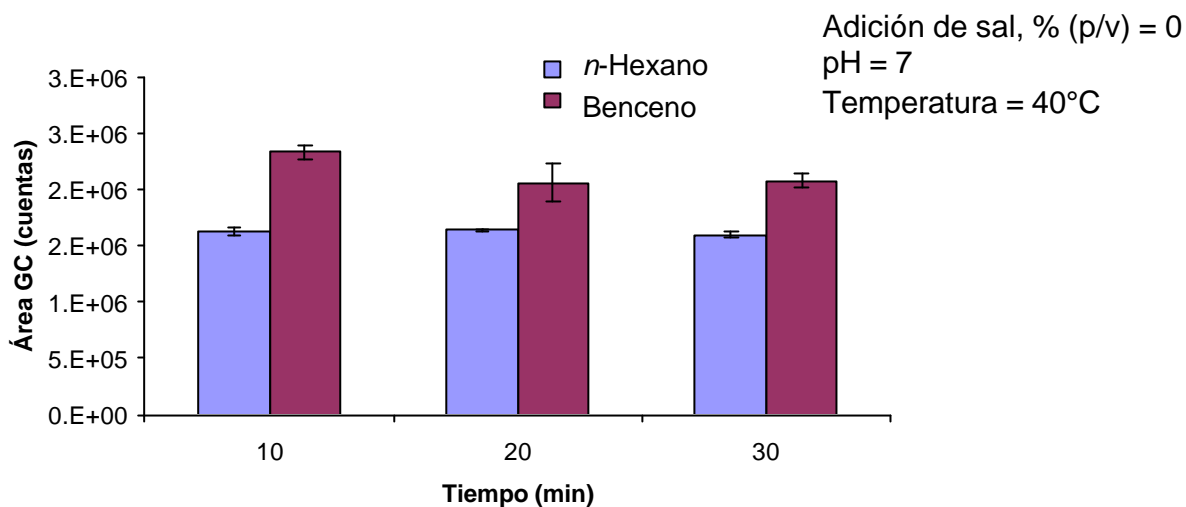
Concentración, ppb	Áreas			s			CV, %		
	\bar{A}_i (n = 3)	\bar{A}_{Istd} (n = 3)	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i	\bar{A}_{Istd}	\bar{A}_i/\bar{A}_{Istd}
5	1380	3840	0,36	88	97	0,014	6	3	4
10	2370	3910	0,606	70	57	0,009	3	2	1
26	6700	3890	1,73	155	58	0,066	2	2	4
52	13000	3840	3,3	1405	95	0,382	11	2	11
78	18900	3760	5,04	283	68	0,033	1	2	1
104	24200	3830	6,3	371	73	0,214	2	2	3
312	66000	3500	18,6	1295	100	0,345	2	3	2

ANEXO 7

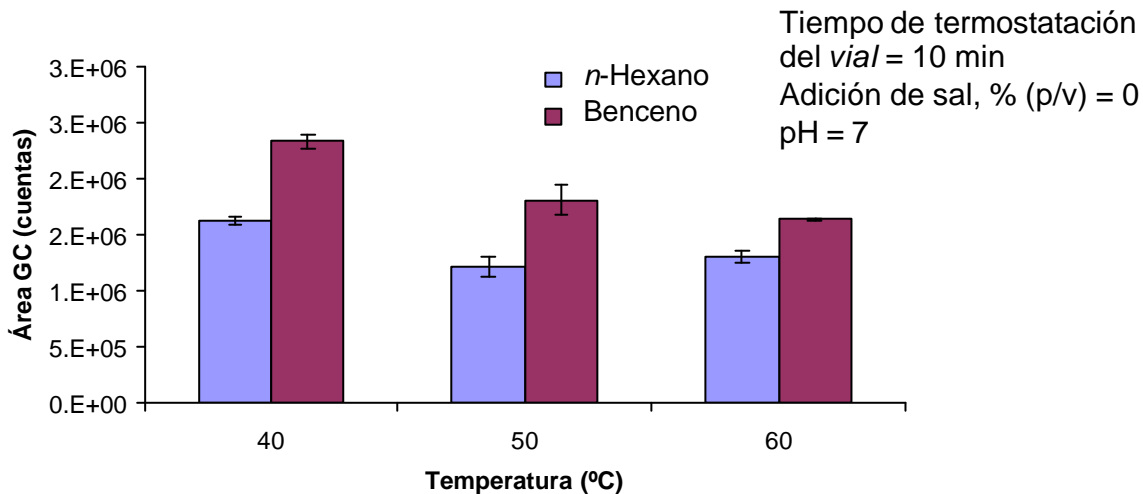
**ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN POR S-HS DE LOS BTEX'S E
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS VOLÁTILES.**

Anexo 7.1. Estudio de la eficiencia de extracción por SHS del *n*-hexano y benceno, bajo diferentes condiciones.

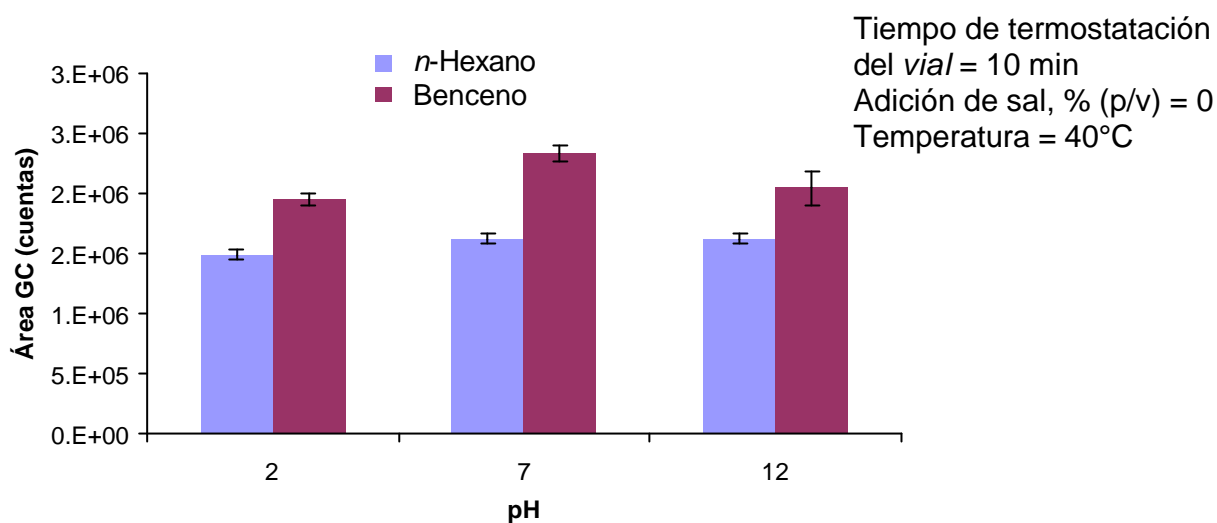
Compuesto	<i>n</i> -Hexano			Benceno			
Parámetro	Área	s	CV, %	Área	s	CV, %	
Volumen de orina (mL)	3	7,600E+05	6,790E+04	9	9,400E+05	6,406E+04	7
	6	1,450E+06	5,361E+04	4	1,600E+06	5,918E+03	0,4
Tiempo de termostatación del <i>vial</i> (min)	10	1,620E+06	3,740E+04	2	2,300E+06	6,182E+04	3
	20	1,641E+06	8,867E+03	1	2,000E+06	1,697E+05	8
	30	1,600E+06	3,053E+04	2	2,080E+06	6,697E+04	3
Temperatura de termostatación del <i>vial</i> (°C)	40	1,620E+06	3,740E+04	2	2,340E+06	6,182E+04	3
	50	1,220E+06	8,474E+04	7	1,800E+06	1,384E+05	8
	60	1,300E+06	5,637E+04	4	1,640E+06	1,511E+04	1
pH de la orina	2	1,490E+06	3,857E+04	3	1,960E+06	4,911E+04	3
	7	1,620E+06	3,740E+04	2	2,340E+06	6,182E+04	3
	12	1,620E+06	4,001E+04	2	2,000E+06	1,387E+05	7
Adición de sal (NaCl, % p/v)	0	1,620E+06	3,740E+04	2	2,340E+06	6,182E+04	3
	10	2,370E+06	6,486E+04	3	2,600E+06	1,482E+05	6
	20	2,160E+06	7,070E+04	3	2,570E+06	9,611E+04	4
	30	1,790E+06	7,815E+04	4	2,520E+06	3,309E+04	1



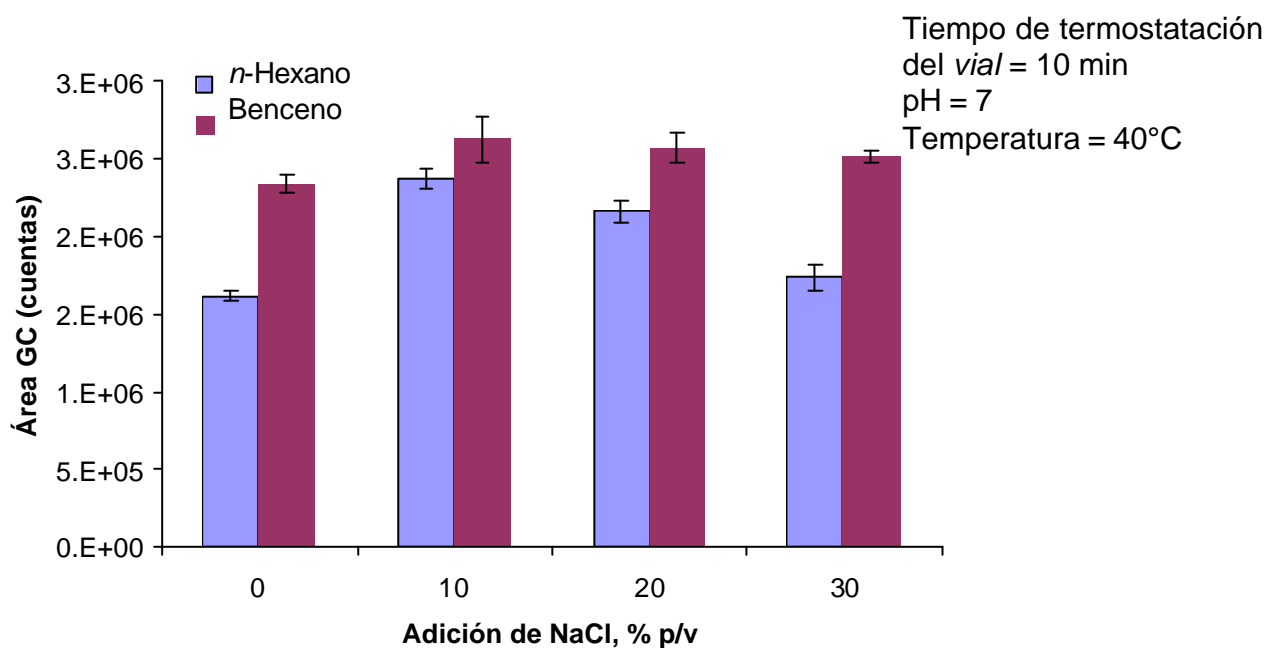
Anexo 7.2 Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del *n*-hexano y benceno, con diferentes tiempos de termostatación del *vial*.



Anexo 7.3 Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del *n*-hexano y benceno, bajo diferentes temperaturas de termostatación del *vial*.



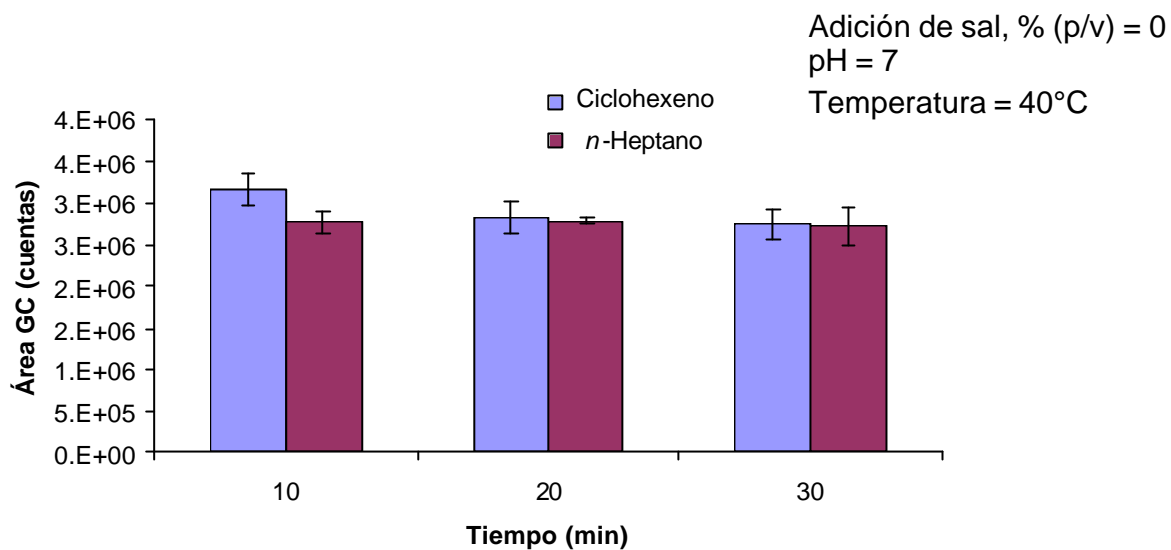
Anexo 7.4 Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del *n*-hexano y benceno, a diferentes pH.



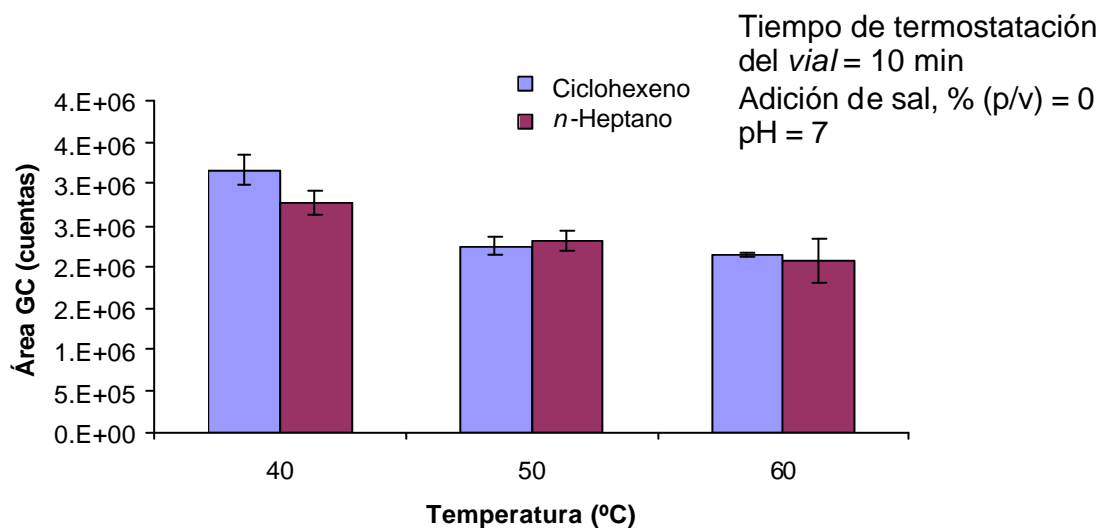
Anexo 7.5 Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del *n*-hexano y benceno, con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.

Anexo 7.6 Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del ciclohexeno y *n*-heptano, bajo diferentes condiciones.

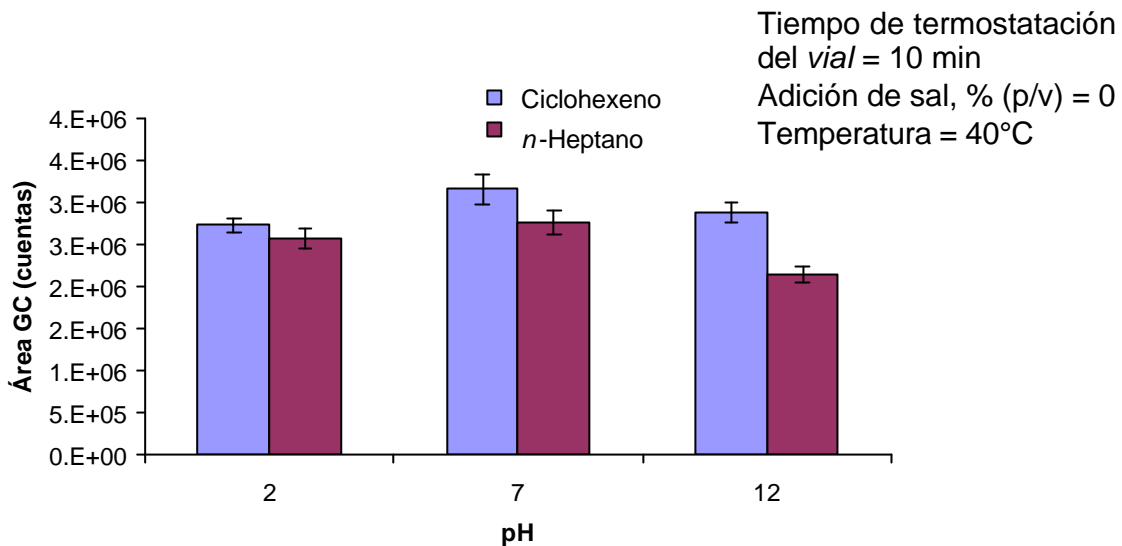
Compuesto	Ciclohexeno			<i>n</i> -Heptano			
Parámetro	Área	s	CV, %	Área	s	CV, %	
Volumen de orina (mL)	3	1,220E+06	3,945E+04	3	1,260E+06	8,720E+04	7
	6	2,280E+06	3,910E+04	2	2,340E+06	3,645E+04	2
Tiempo de termostatación del <i>vial</i> (min)	10	3,200E+06	1,827E+05	6	2,800E+06	1,397E+04	5
	20	2,800E+06	1,917E+05	7	2,770E+06	3,386E+03	1
	30	2,700E+06	1,805E+05	7	2,700E+06	2,263E+04	8
Temperatura de termostatación del <i>vial</i> (°C)	40	3,200E+06	1,827E+05	6	2,800E+06	1,397E+04	5
	50	2,240E+06	9,807E+04	4	2,300E+06	1,283E+04	6
	60	2,140E+06	1,940E+04	1	2,000E+06	2,502E+04	13
pH de la orina	2	2,730E+06	7,846E+04	3	2,600E+06	1,201E+04	5
	7	3,200E+06	1,827E+05	6	2,800E+06	1,397E+04	5
	12	2,900E+06	1,181E+05	4	2,140E+06	9,051E+04	4
Adición de sal (NaCl, % p/v)	0	3,200E+06	1,827E+05	6	2,800E+06	1,397E+05	5
	10	3,800E+06	3,097E+05	8	4,000E+06	1,881E+05	5
	20	3,360E+06	3,274E+04	1	3,550E+06	7,480E+04	2
	30	3,300E+06	1,054E+05	3	2,870E+06	9,370E+04	3



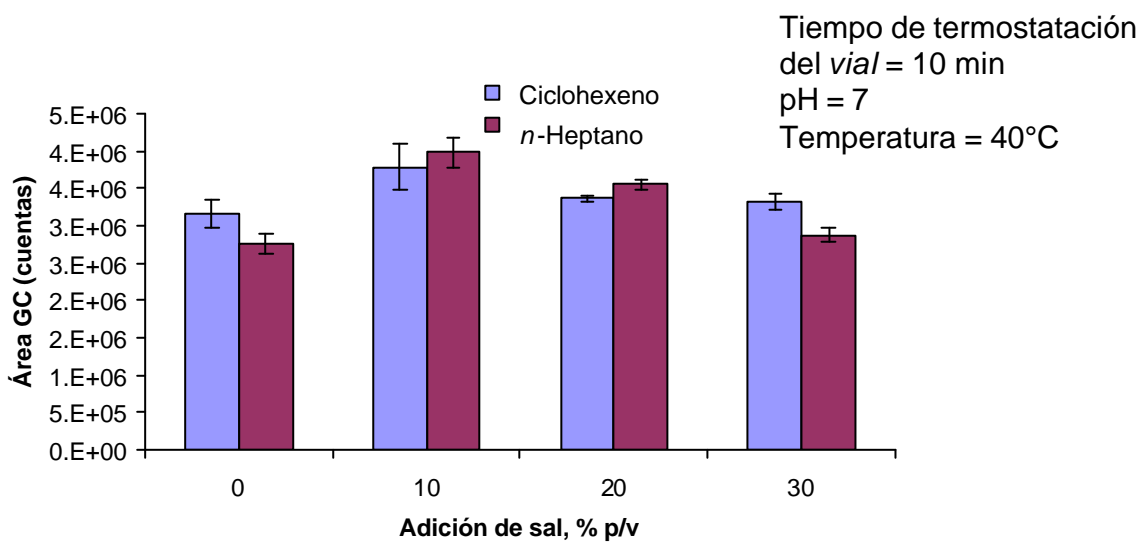
Anexo 7.7. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del ciclohexeno y *n*-heptano, bajo diferentes tiempos de termostatación del *vial*.



Anexo 7.8. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del ciclohexeno y *n*-heptano, bajo diferentes temperaturas de termostatación del *vial*.



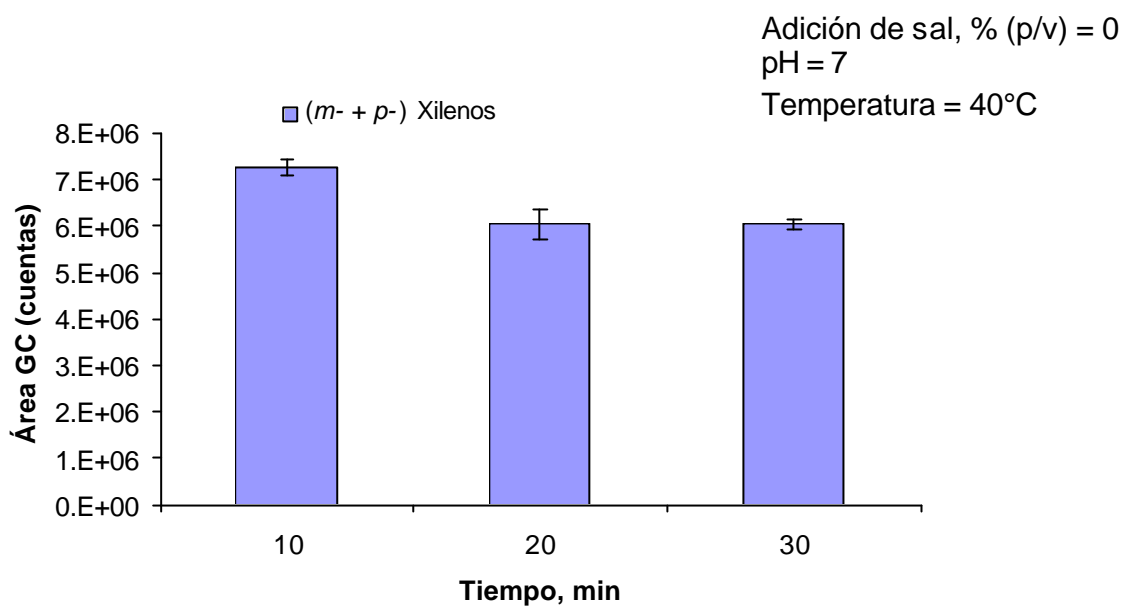
Anexo 7.9. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del ciclohexeno y *n*-heptano, a diferentes pH.



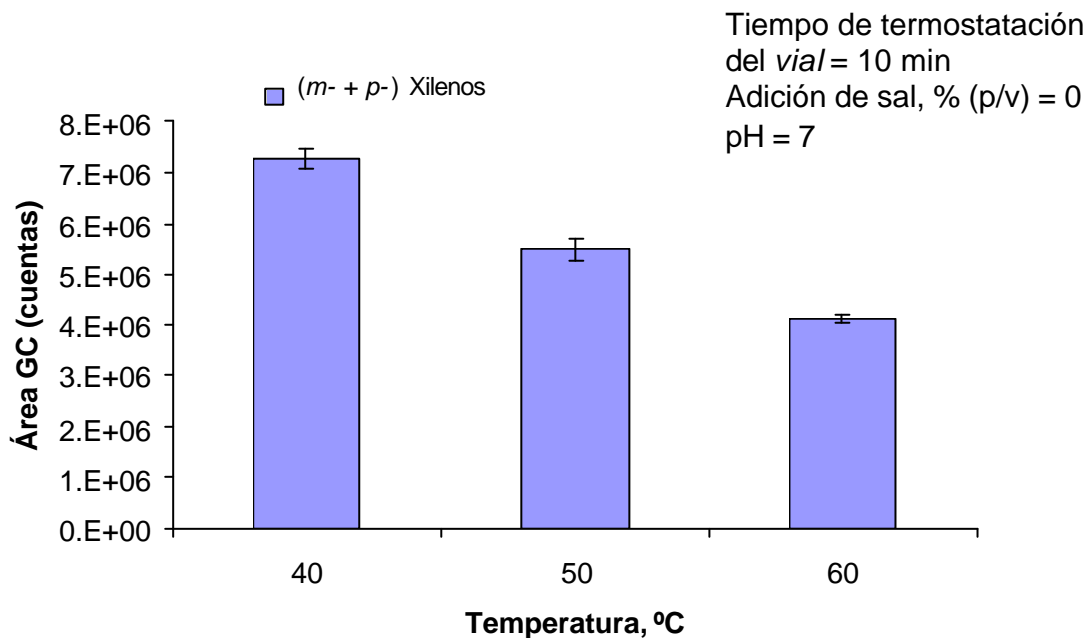
Anexo 7.10. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS del ciclohexeno y *n*-heptano, con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.

Anexo 7.11. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS de los (*m*- + *p*-) xilenos, bajo diferentes condiciones.

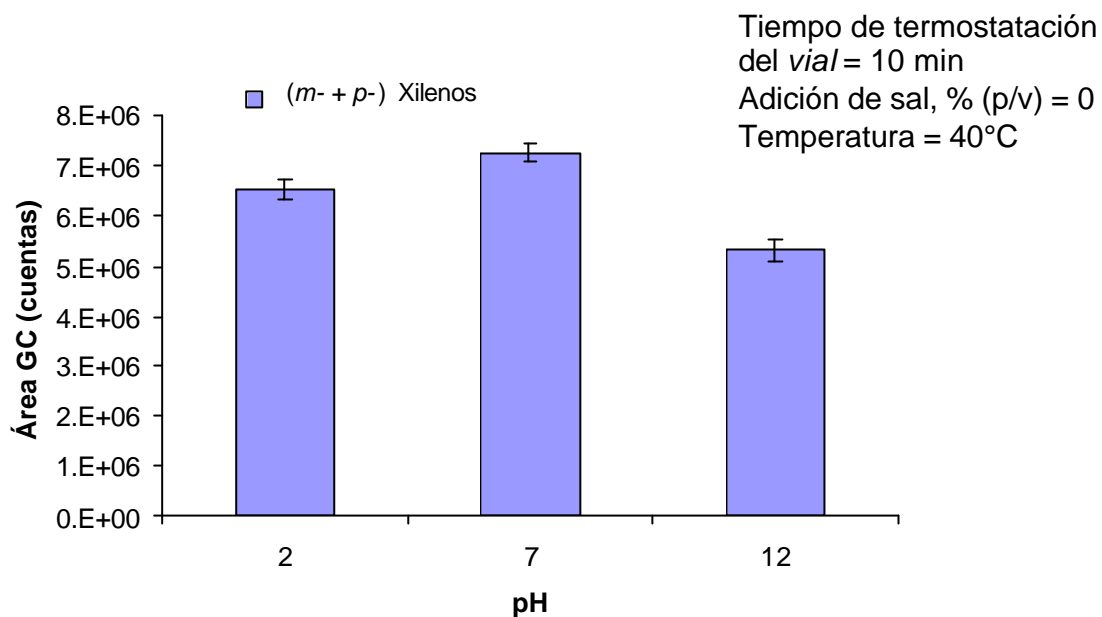
Compuesto		<i>(m</i> - + <i>p</i> -) Xilenos		
Parámetro		Área	s	CV, %
Volumen de orina (mL)	3	2,610E+06	9.3970.E+04	3
	6	4,300E+06	6.5785.E+04	1
Tiempo de termostatación del <i>vial</i> (min)	10	7,300E+06	1.8454.E+05	2
	20	6,000E+06	3.3695.E+05	4
	30	6,050E+06	1.3010.E+05	2
Temperatura de termostatación del <i>vial</i> (°C)	40	7,300E+06	1.8454.E+05	2
	50	5,500E+06	2.3145.E+05	3
	60	4,100E+06	7.4485.E+04	1
pH de la orina	2	6,500E+06	1.9827.E+05	2
	7	7,300E+06	1.8454.E+05	2
	12	5,300E+06	2.1286.E+05	3
Adición de sal (NaCl, % p/v)	0	7,300E+06	1.8454.E+05	2
	10	7,340E+06	1.3164.E+05	1
	20	7,050E+06	1.0849.E+05	1
	30	5,800E+06	2.2586.E+05	3



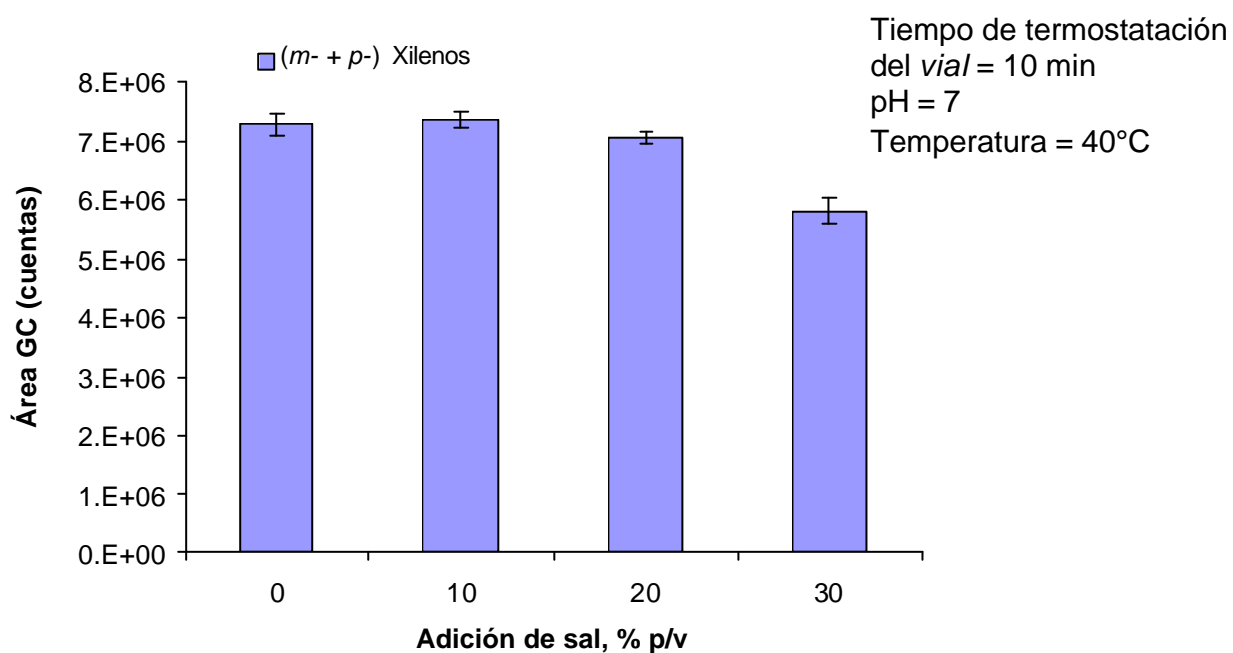
Anexo 7.12. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS de los (*m*- + *p*-) xilenos, bajo diferentes tiempos de termostatación del *vial*



Anexo 7.13. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS de los (*m*- + *p*-) xilenos, bajo diferentes temperaturas de termostatación del *vial*



Anexo 7.14. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS de los (m- + p-) xilenos, a diferentes pH.



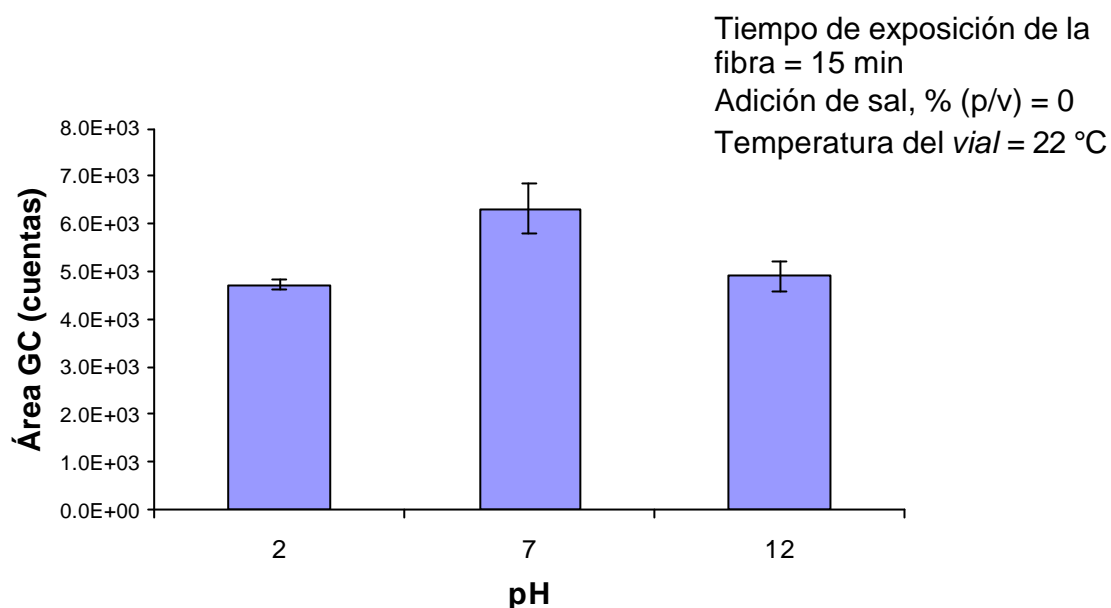
Anexo 7.15. Estudio de la eficiencia de extracción por S-HS de los (m- + p-) xilenos, con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.

ANEXO 8

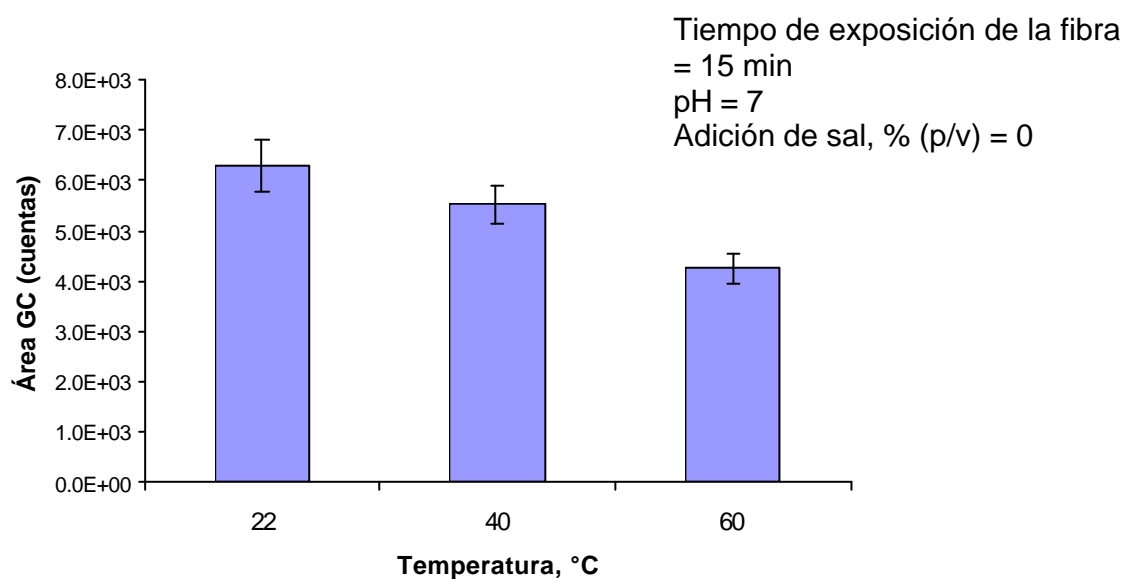
**ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE LOS BTEX's E
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS VOLÁTILES, AISLADOS POR HS-SPME
MODIFICANDO LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN.**

Anexo 8.1 Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexano y benceno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), modificando las condiciones de extracción.

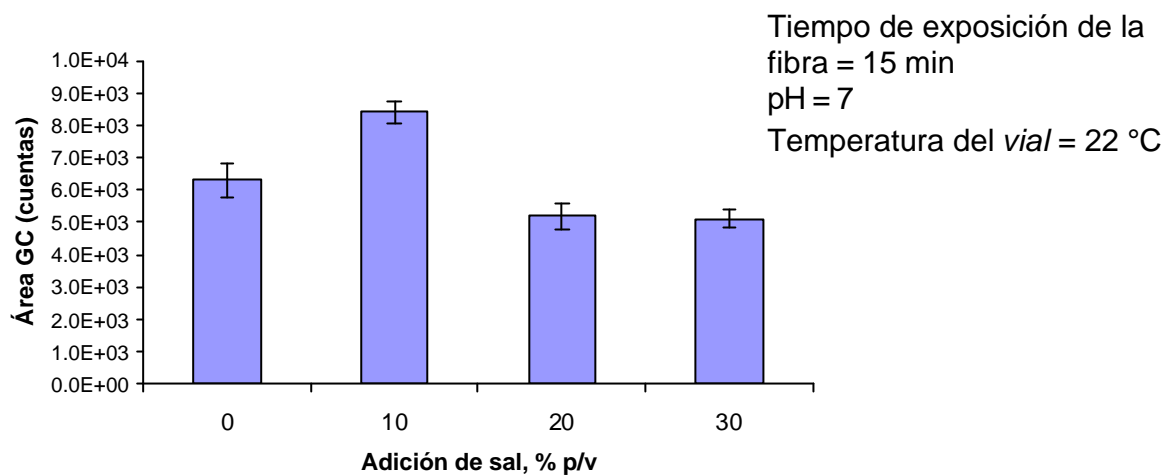
Compuesto		<i>n</i> -Hexano			Benceno		
Parámetro		Área	s	CV, %	Área	s	CV, %
pH de la orina	2	4,720E+03	9,500E+01	2	2,840E+05	8,505E+03	3
	7	6,300E+03	5,230E+02	8	3,180E+05	6,212E+03	2,0
	12	4,900E+03	3,030E+02	6	2,700E+05	1,098E+04	4
Temperatura del vial (°C)	22	6,300E+03	5,230E+02	8	3,180E+05	6,212E+03	2,0
	40	5,500E+03	3,650E+02	7	3,270E+05	6,542E+03	2
	60	4,300E+03	2,850E+02	7	2,820E+05	8,472E+03	3
Adición de sal (NaCl, % p/v)	0	6,300E+03	5,230E+02	8	3,180E+05	6,212E+03	2,0
	10	8,410E+03	3,490E+02	4,1	3,660E+05	8,741E+03	2
	20	5,200E+03	4,000E+02	8	3,800E+05	1,644E+04	4
	30	5,100E+03	2,600E+02	5	4,020E+05	4,028E+03	1
Tiempo de exposición de la fibra, min	2	4,500E+03	2,840E+01	6	2,900E+05	1,288E+04	4
	5	5,000E+03	2,760E+02	6	2,790E+05	6,353E+03	2
	10	5,700E+03	2,710E+02	5	3,280E+05	7,642E+03	2,3
	15	6,300E+03	5,230E+02	8	3,180E+05	6,212E+03	2,0
	30	3,510E+03	9,900E+01	3	2,760E+05	8,481E+03	3



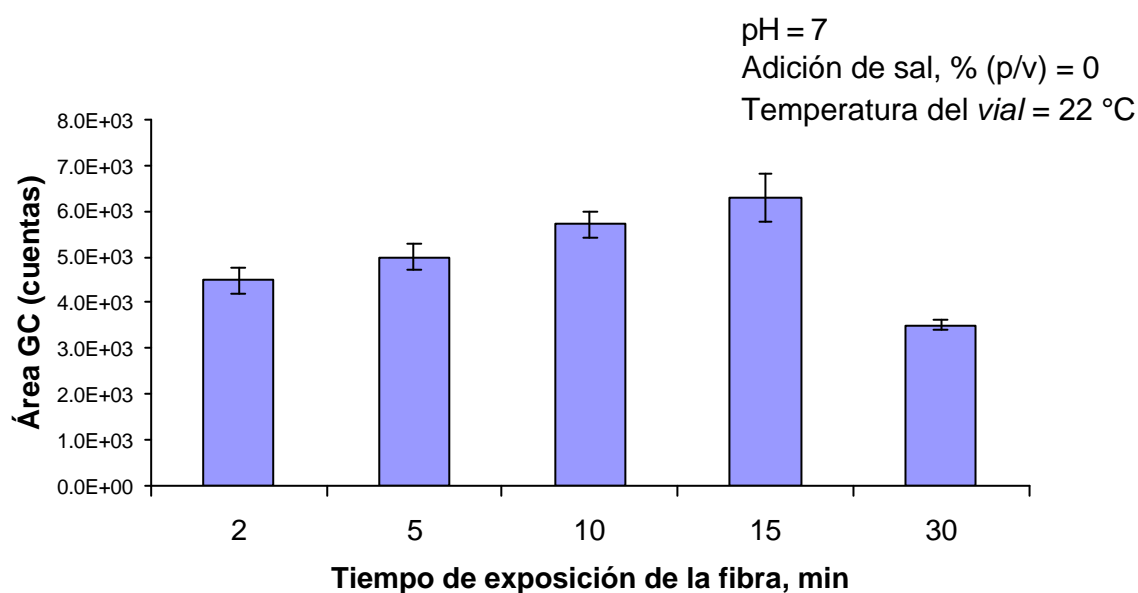
Anexo 8.1.1. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.



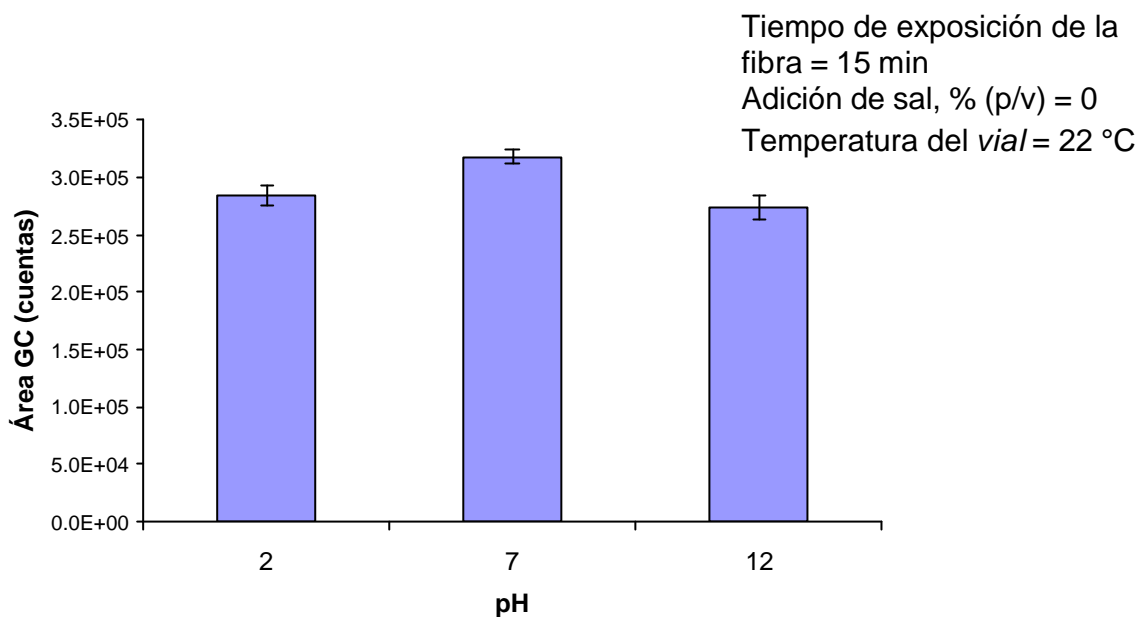
Anexo 8.1.2. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes temperaturas del *vial*.



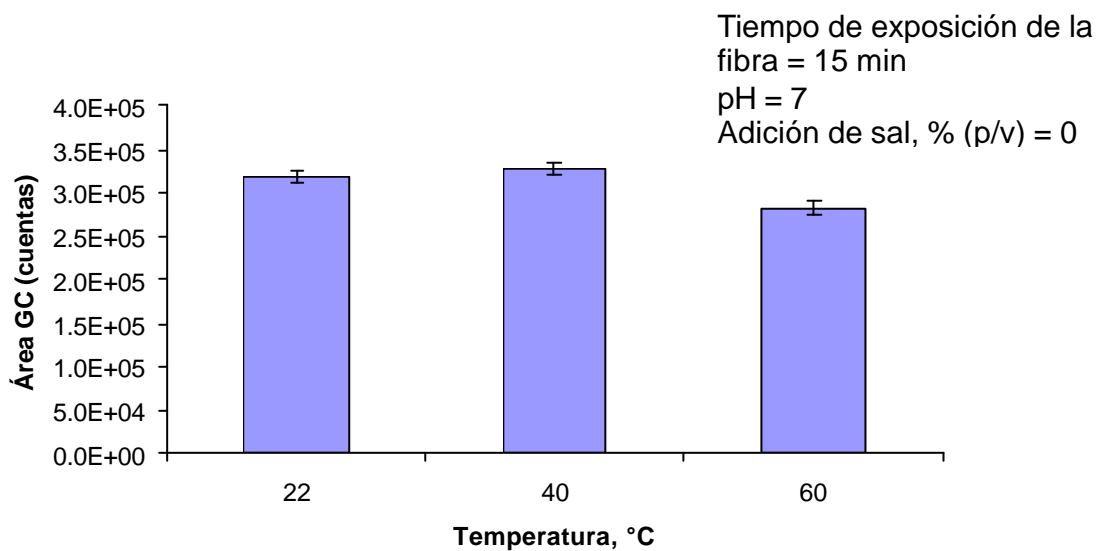
Anexo 8.1.3. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.



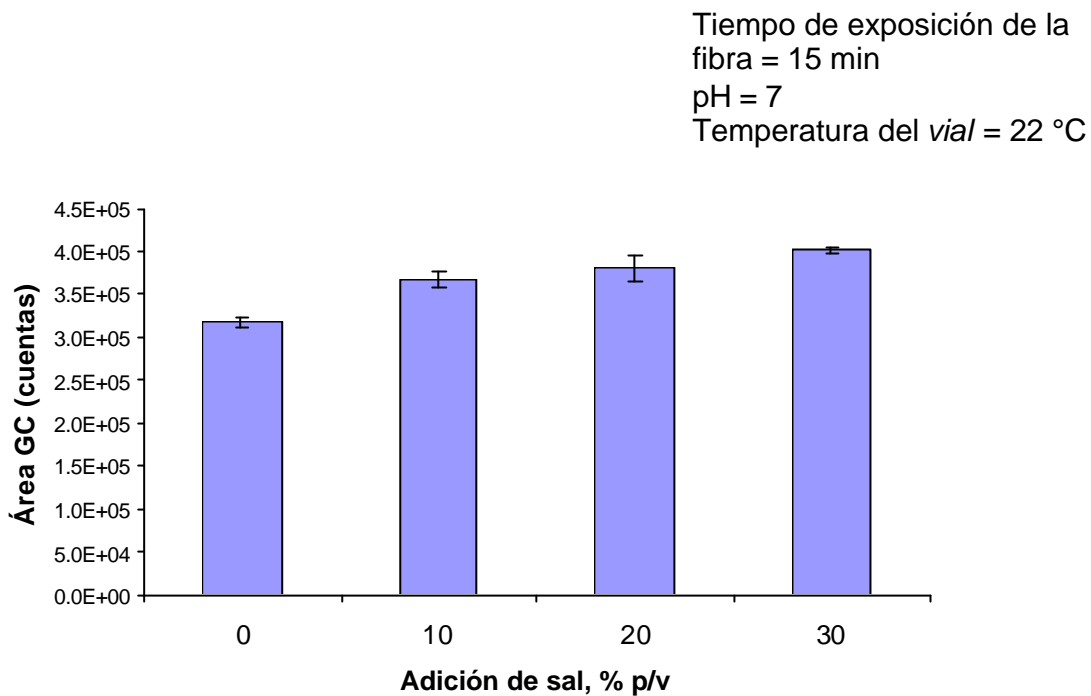
Anexo 8.1.4. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes tiempos de exposición de la fibra.



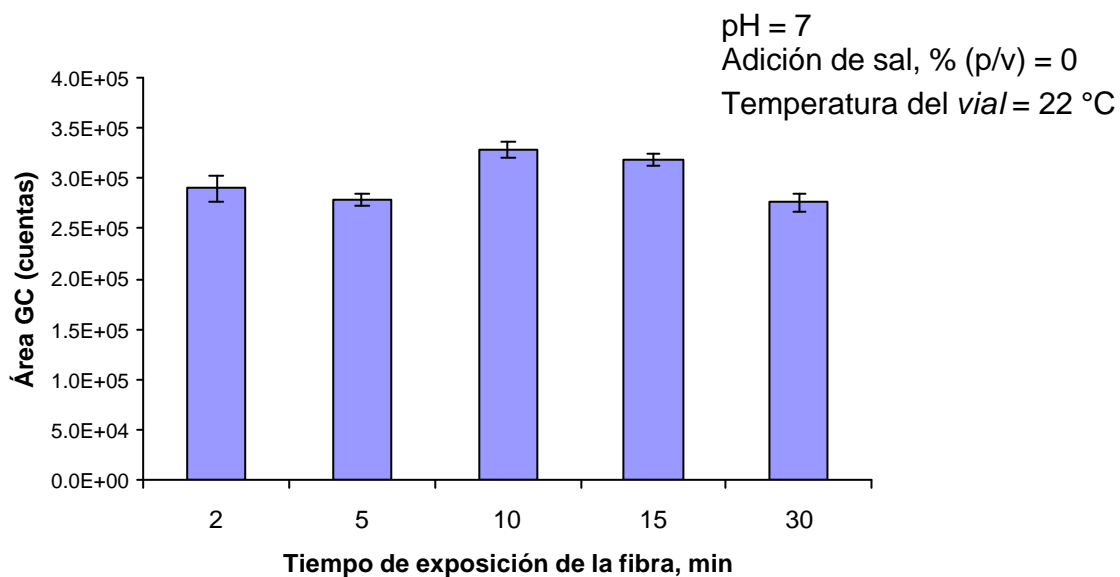
Anexo 8.1.5. Estudio de la eficiencia de extracción del benceno, aislado por HS-SPME (PDMS 100 mm), a diferentes pH.



Anexo 8.1.6. Estudio de la eficiencia de extracción del benceno aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes temperaturas del *vial*.



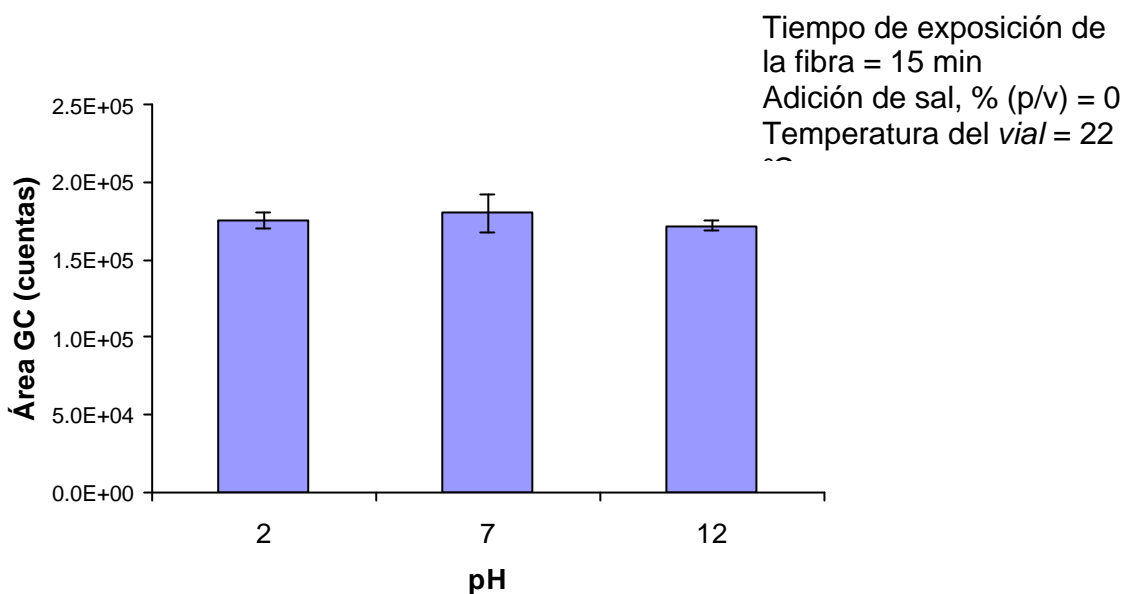
Anexo 8.1.7. Estudio de la eficiencia de extracción del benceno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.



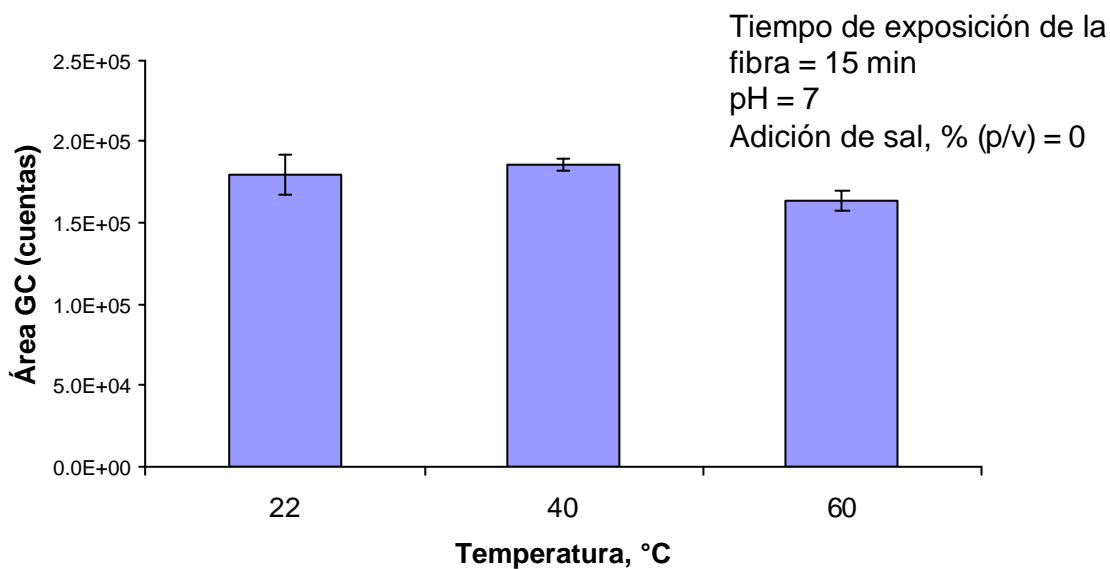
Anexo 8.1.8. Estudio de la eficiencia de extracción para benceno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes tiempos de exposición de la fibra.

Anexo 8.2. Estudio de la eficiencia de extracción del ciclohexeno y *n*-heptano, aislados por HS-SPME (PDMS 100 μ m), al modificar las condiciones.

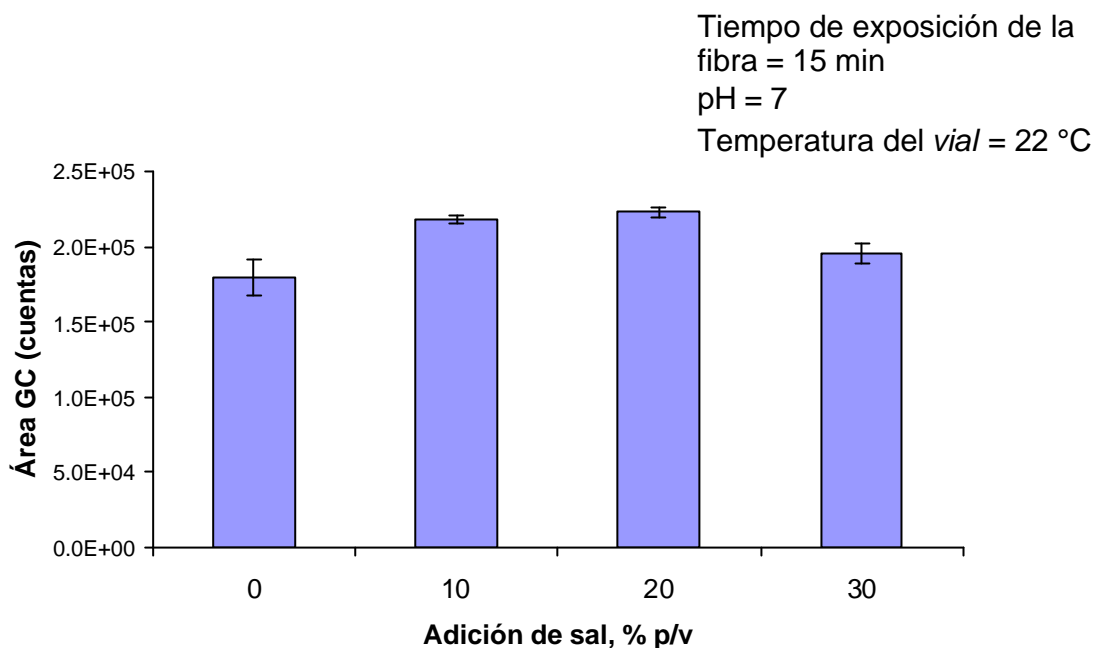
Compuesto		Ciclohexeno			<i>n</i> -Heptano		
Parámetro		Área	s	CV, %	Área	s	CV, %
pH de la orina	2	1,760E+05	5,156 E+03	3	1,570E+03	4,700E+01	3
	7	1,800E+05	1,2118E+04	7	1,790E+03	6,800E+01	4
	12	1,720E+05	3,312 E+03	2	1,520E+03	3,000E+01	2
Temperatura del vial (°C)	22	1,800E+05	1,2118E+04	7	1,790E+03	6,800E+02	4
	40	1,860E+05	3,614 E+03	2	1,750E+03	8,700E+01	5
	60	1,640E+05	6,317 E+03	4	1,450E+03	4,300E+01	3
Adición de sal (NaCl, % p/v)	0	1,800E+05	1,2118E+04	7	1,790E+03	6,800E+01	4
	10	2,190E+05	2,730E+03	1	2,800E+03	1,030E+01	4
	20	2,230E+05	3,186E+03	1	1,940E+03	9,000E+01	5
	30	1,960E+05	6,700 E+03	3	1,420E+03	6,200E+01	4
Tiempo de exposición de la fibra, min	2	1,700E+05	1,2461E+04	7	1,470E+03	4,100E+01	3
	5	1,740E+05	2,826 E+03	2	1,550E+03	3,700E+01	2
	10	1,920E+05	9,339 E+03	5	1,820E+03	9,200E+01	5
	15	1,800E+05	1,2118E+04	7	1,790E+03	6,800E+01	4
	30	1,460E+05	5,640 E+03	4	1,250E+03	4,800E+01	4



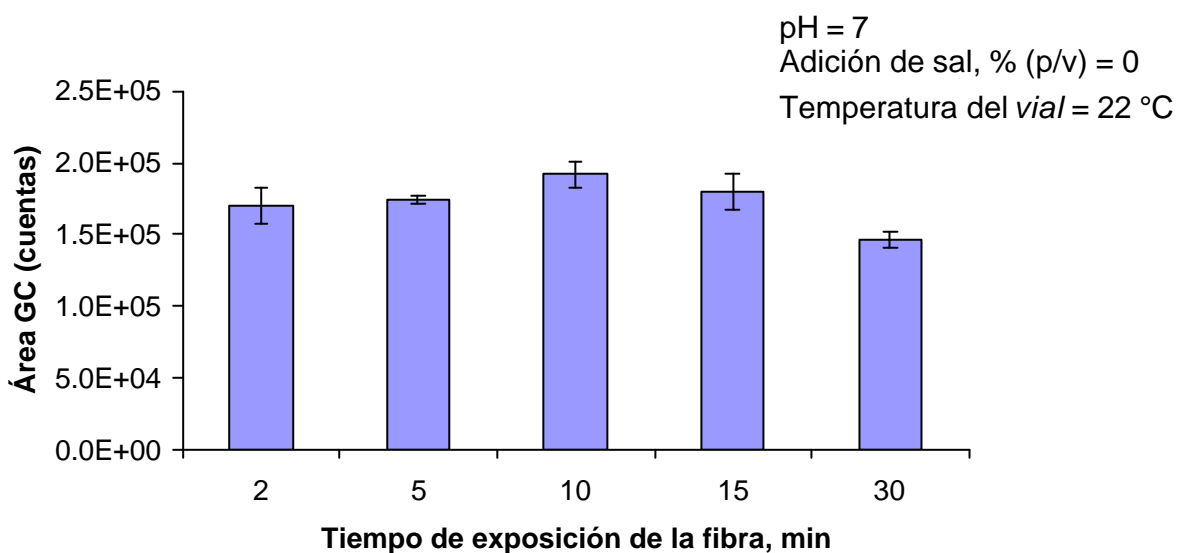
Anexo 8.2.1. Estudio de la eficiencia de extracción del ciclohexeno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.



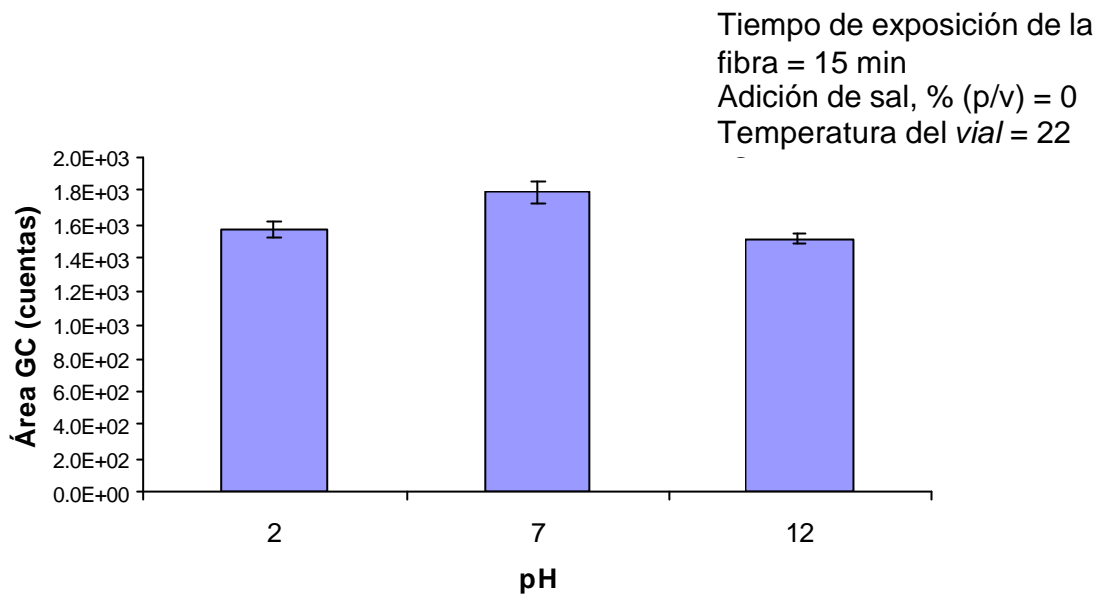
Anexo 8.2.2. Estudio de la eficiencia de extracción del ciclohexeno aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes temperaturas del *vial*.



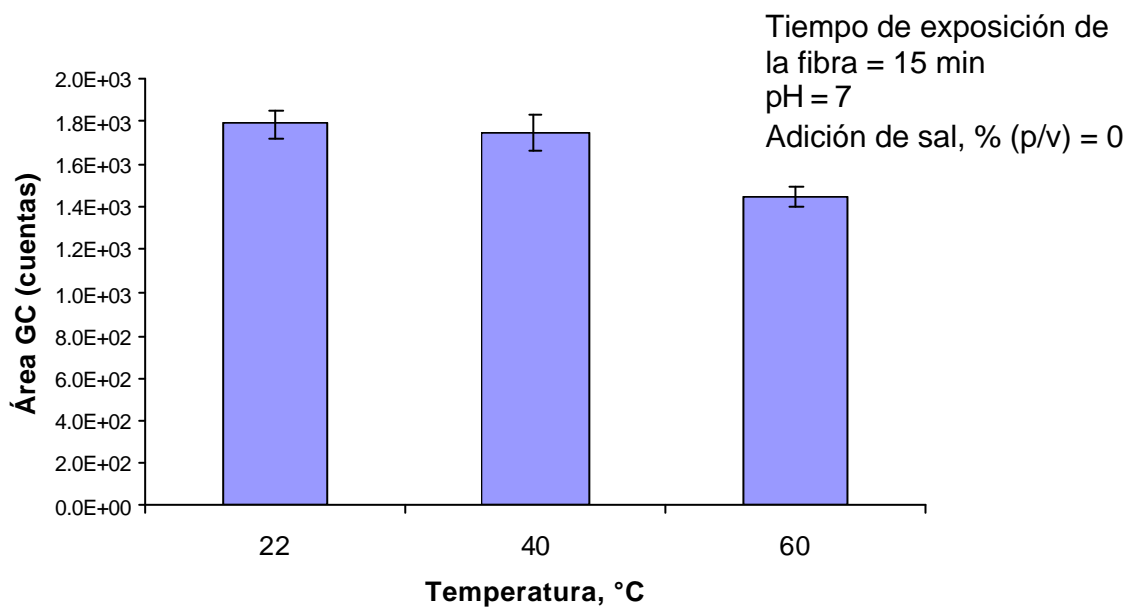
Anexo 8.2.3. Estudio de la eficiencias de extracción del ciclohexeno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.



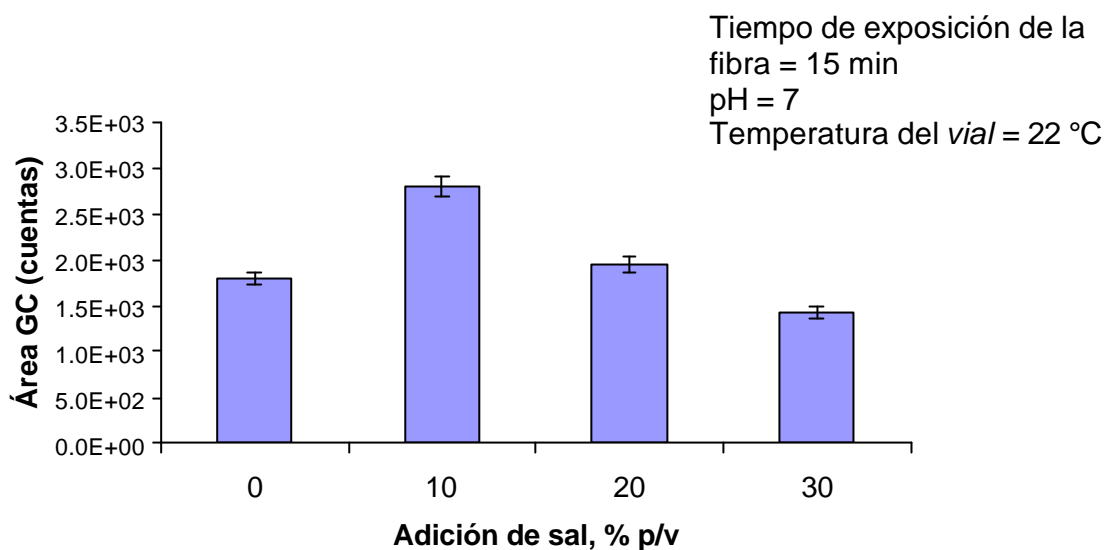
Anexo 8.2.4. Estudio de la eficiencia de extracción del ciclohexeno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes tiempos de exposición de la fibra.



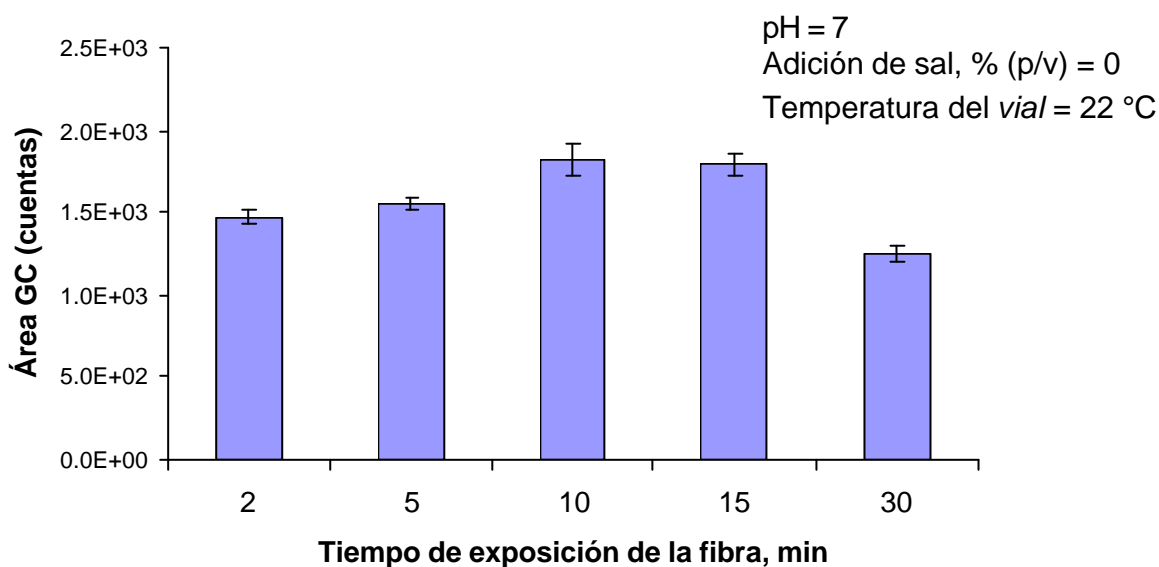
Anexo 8.2.5. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-heptano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.



Anexo 8.2.6. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-heptano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes temperaturas del *vial*.



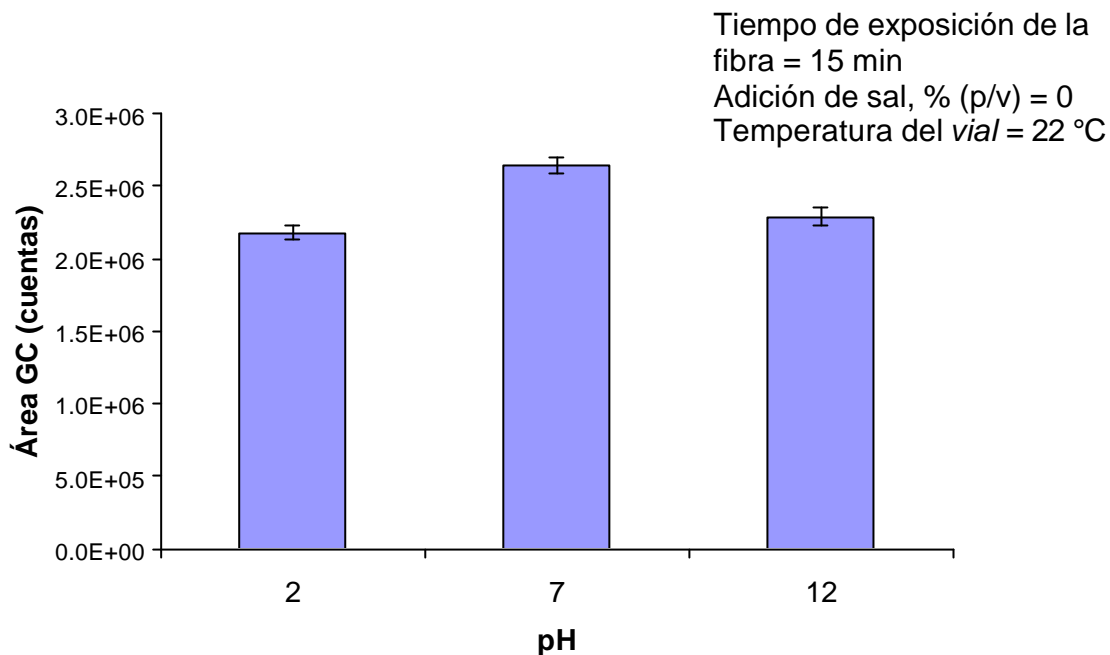
Anexo 8.2.7. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-heptano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.



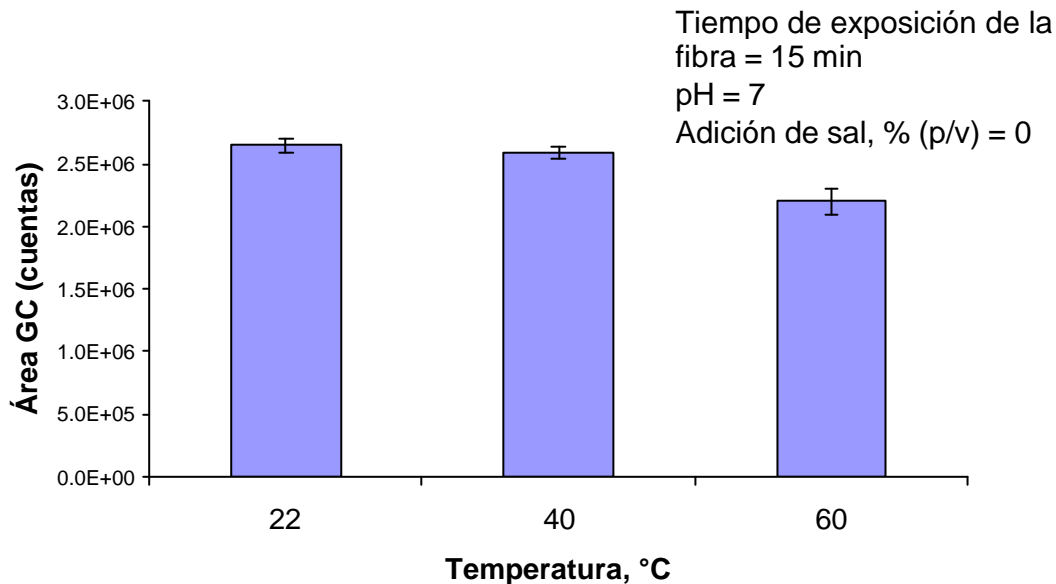
Anexo 8.2.8. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-heptano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes tiempos de exposición de la fibra.

Anexo 8.3. Estudio de la eficiencia de extracción por HS-SPME del o-xileno y n-hexadecano modificando las condiciones de extracción.

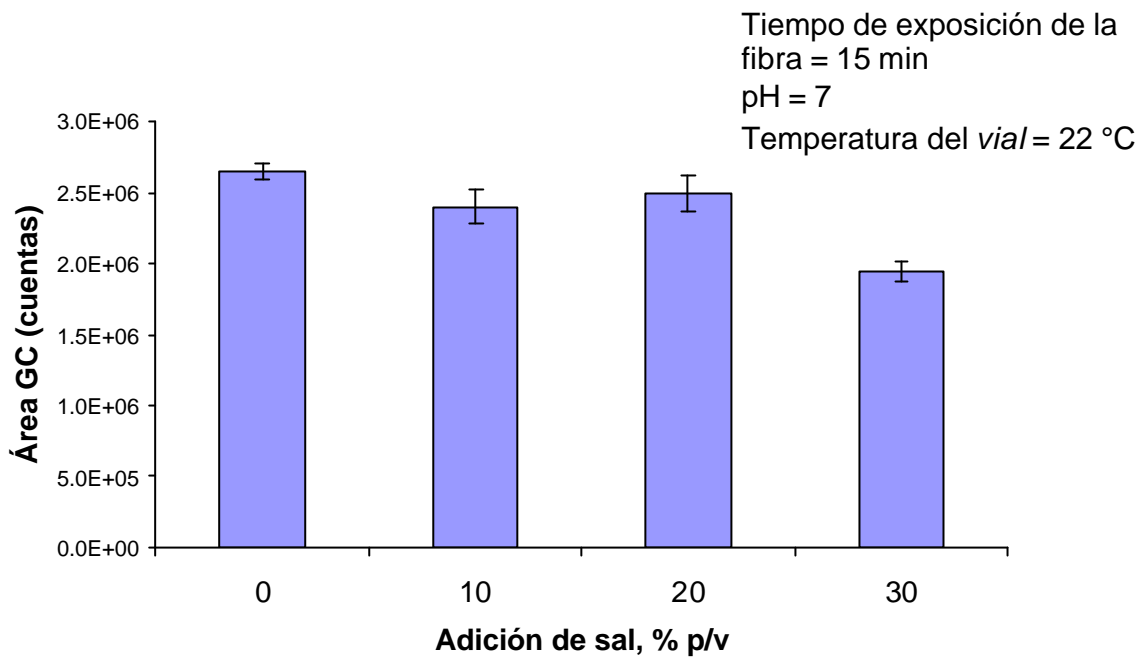
Compuesto		o-Xileno			n-Hexadecano		
Parámetro		Área	s	CV, %	Área	s	CV, %
pH de la orina	2	2,180E+06	5,186E+04	2	6,130E+04	1,607E+03	3
	7	2,650E+06	5,557E+04	2	1,600E+05	1,054E+04	7
	12	2,290E+06	6,554E+04	3	6,050E+04	1,589E+03	3
Temperatura del vial (°C)	22	2,650E+06	5,557E+04	2	1,600E+05	1,054E+04	7
	40	2,590E+06	4,968E+04	2	1,940E+05	4,814E+03	2
	60	2,200E+06	1,024E+05	5	2,140E+05	8,361E+03	4
Adición de sal (NaCl, % p/v)	0	2,650E+06	5,557E+04	2	1,600E+05	1,054E+04	7
	10	2,400E+06	1,202E+05	5	1,130E+05	1,756E+03	2
	20	2,500E+06	1,278E+05	5	1,020E+05	4,956E+03	5
	30	1,950E+06	6,933E+04	4	1,240E+05	4,353E+03	4
Tiempo de exposición de la fibra, min	2	2,190E+06	4,779E+04	2	2,200E+04	1,633E+03	7
	5	2,185E+06	2,959E+04	1	6,090E+04	2,392E+03	4
	10	2,480E+07	1,530E+05	1	1,130E+05	3,563E+03	3
	15	2,650E+06	5,557E+04	2	1,600E+05	1,054E+04	7
	30	2,600E+06	1,452E+05	6	3,253E+05	2,310E+03	0,7



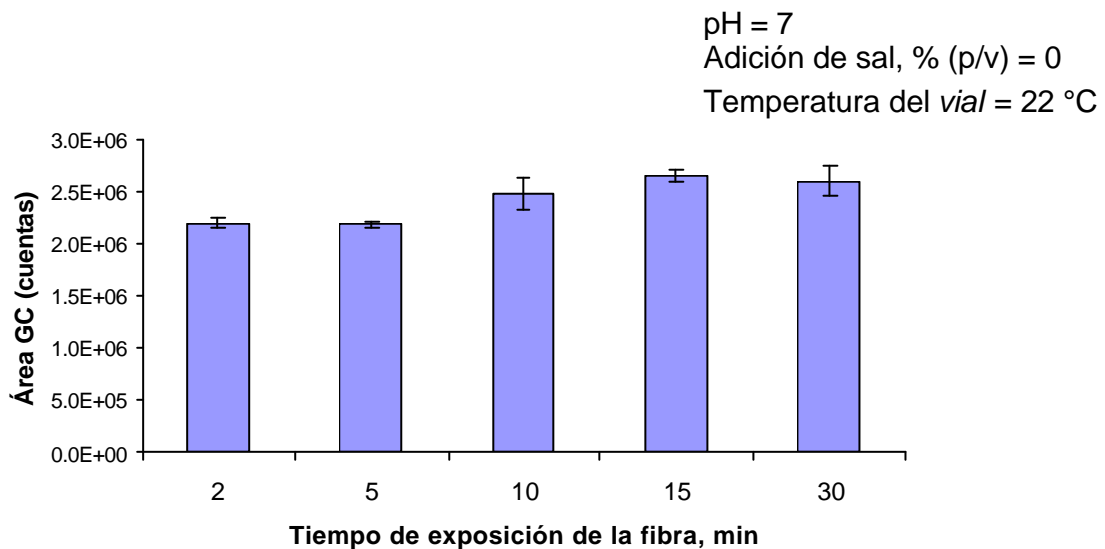
Anexo 8.3.1. Estudio de la eficiencia de extracción del *o*-xileno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.



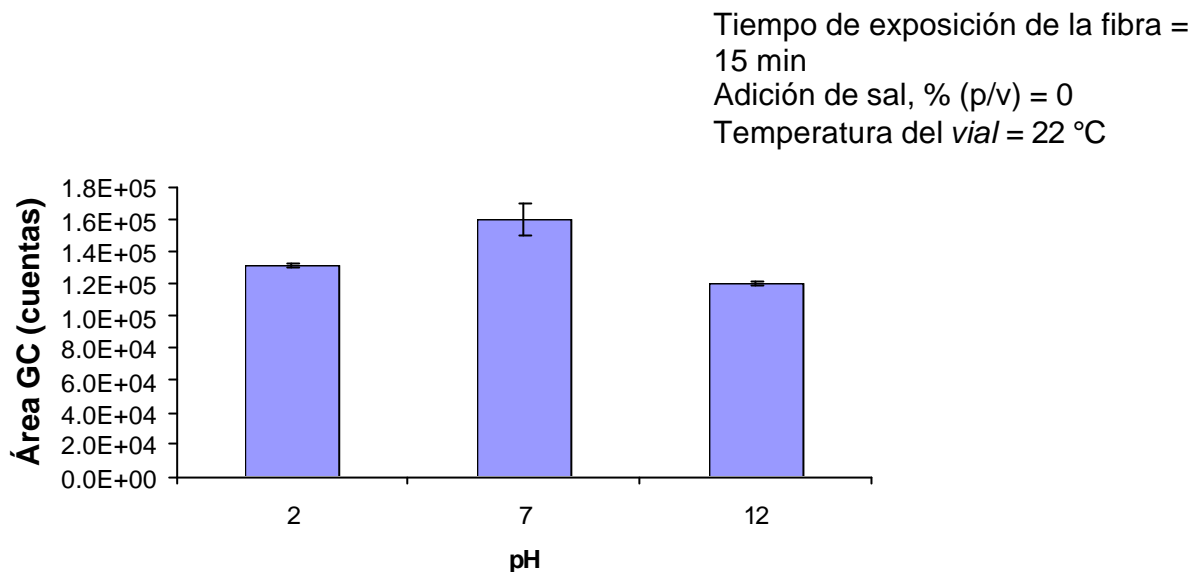
Anexo 8.3.2. Estudio de la eficiencia de extracción del *o*-xileno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), bajo diferentes temperaturas del *vial*.



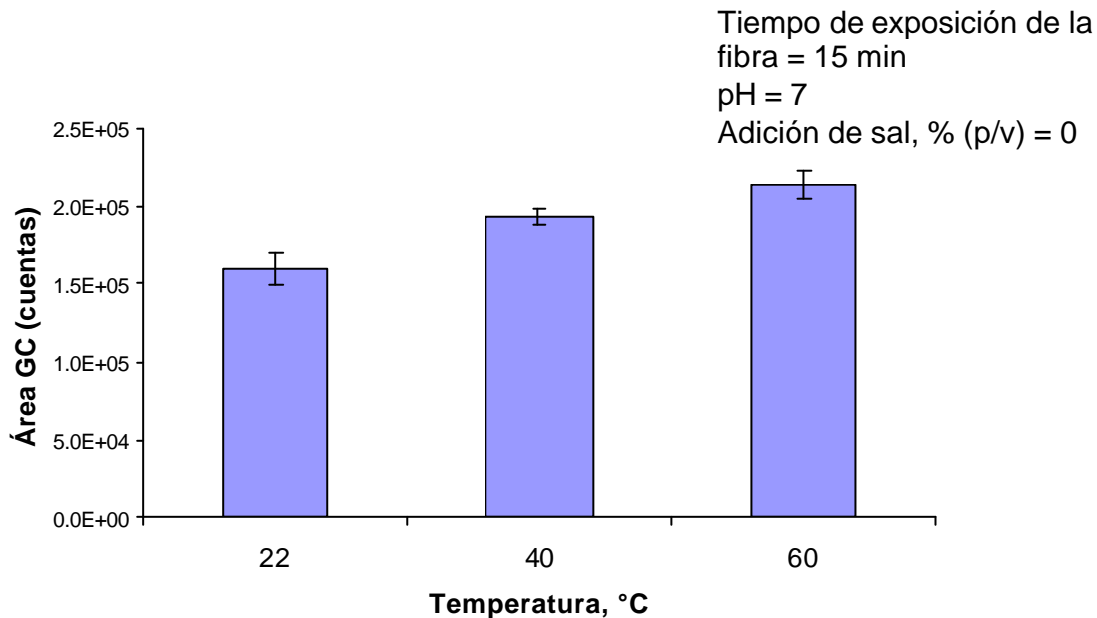
Anexo 8.3.3. Estudio de la eficiencia de extracción del *o*-xileno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.



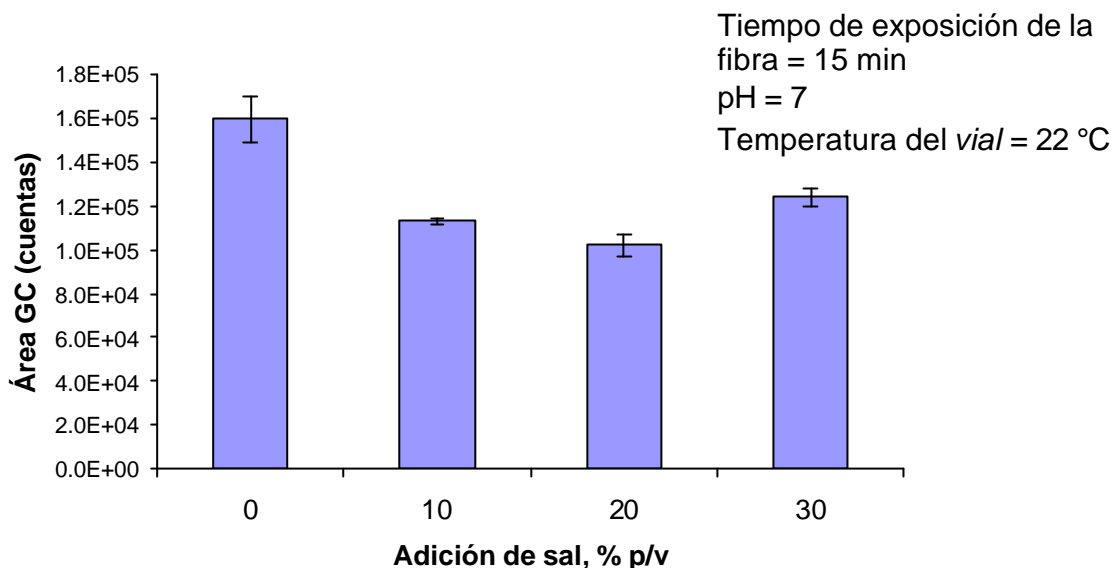
Anexo 8.3.4. Estudio de la eficiencia de extracción del *o*-xileno, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes tiempos de exposición de la fibra.



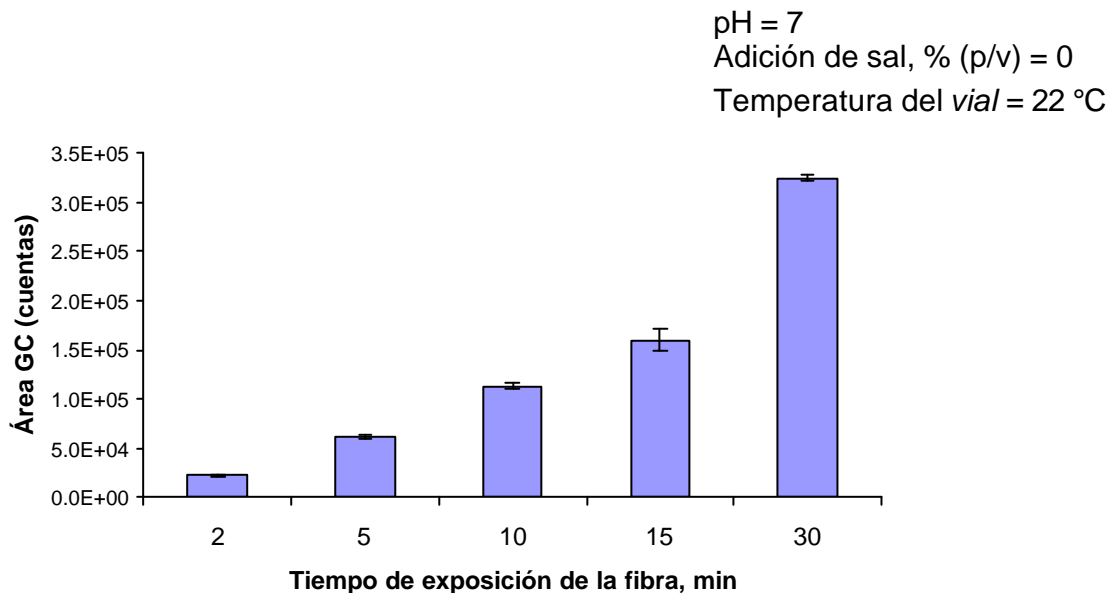
Anexo 8.3.5. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexadecano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes pH.



Anexo 8.3.6. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexadecano aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), bajo diferentes temperaturas del *vial*.



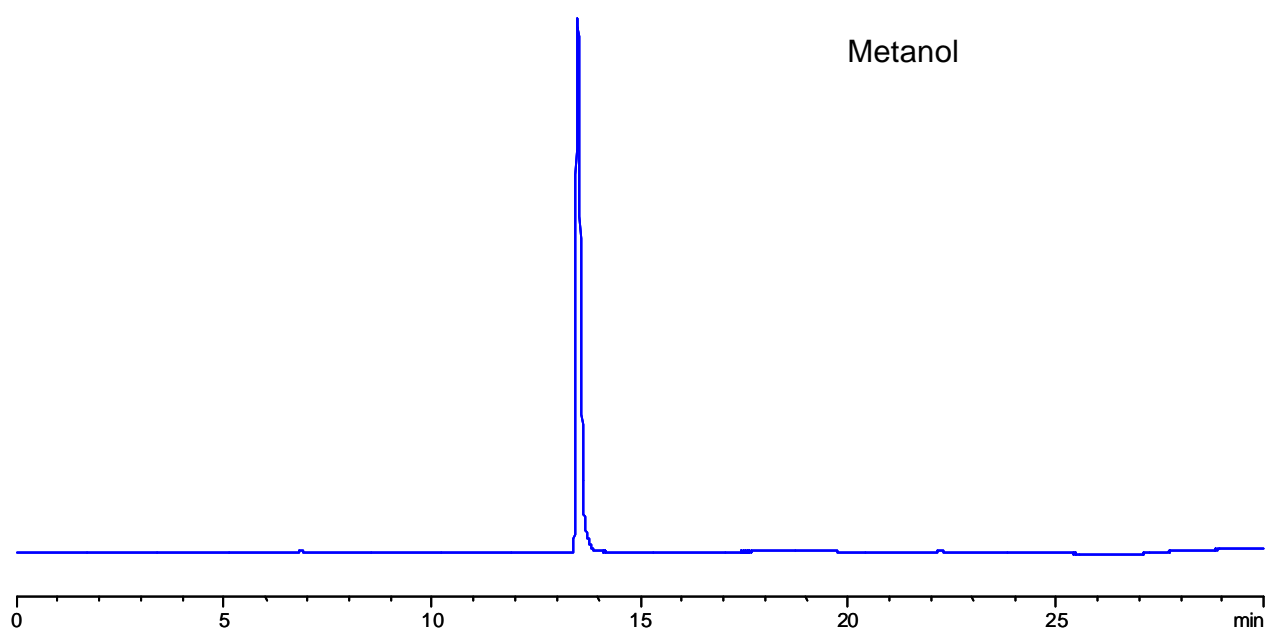
Anexo 8.3.7. Estudio de la eficiencia de extracción del *n*-hexadecano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), con diferentes % (p/v) de sal (NaCl) añadida.



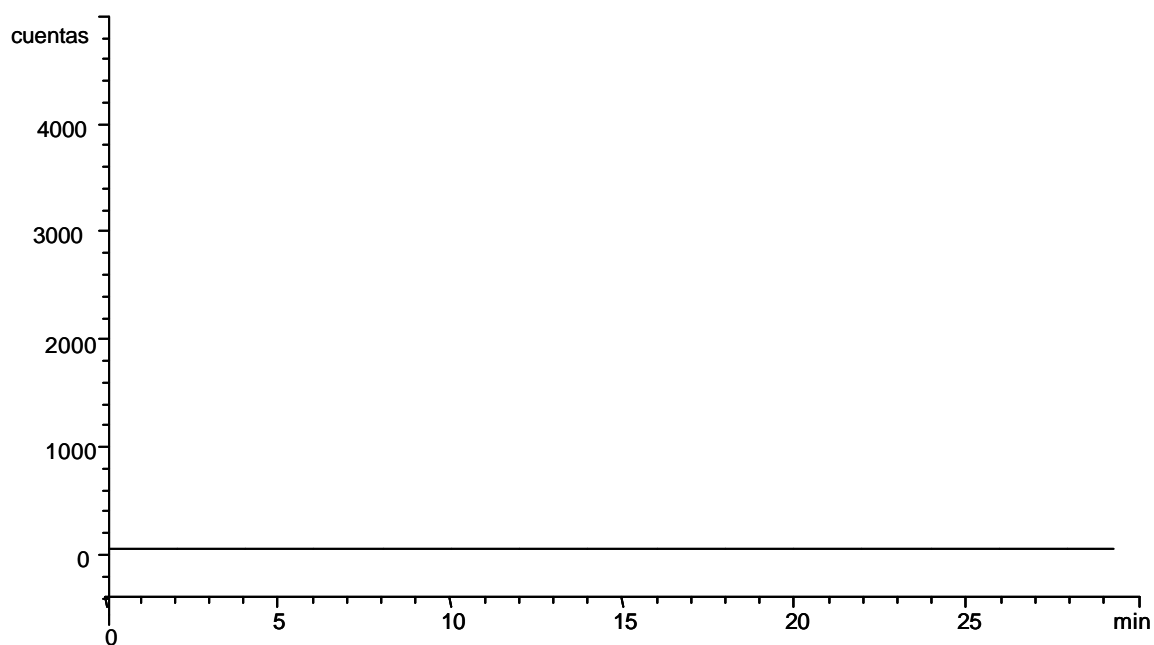
Anexo 8.3.8. Estudio de la eficiencias de extracción para *n*-hexadecano, aislado por HS-SPME (PDMS, 100 mm), a diferentes tiempos de exposición de la fibra.

ANEXO 9

Perfiles cromatográficos del blanco del solvente (metanol) y de la orina, analizada por HS-SPME/HRGC-FID (PDMS, 100 µm). Columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52 mm (f.e.).



Anexo 9.1. Perfil cromatográfico del blanco del solvente (metanol) usado en los métodos S-HS y HS-SPME/HRGC-FID (PDMS, 100 μ m). Columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52 mm (f.e.).



Anexo 9.2. Cromatograma del blanco de orina, obtenido por HS-SPME/HRGC-FID, (PDMS, 100 μ m). Columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52 mm (f.e.).

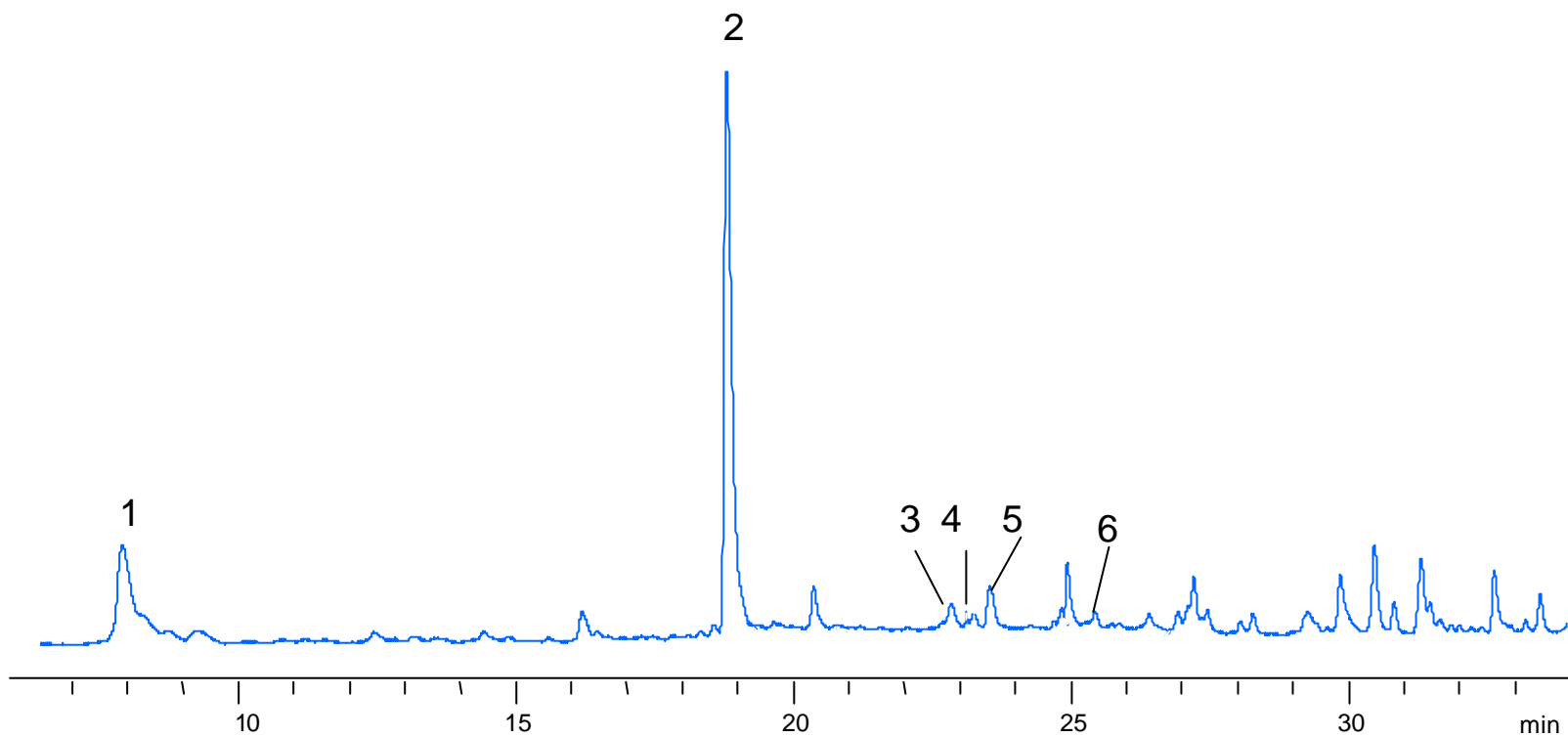
ANEXO 10

**CURVAS DE CALIBRACIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN DE LOS BTEX's E
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS, DETERMINADOS PARA MUESTRAS DE AIRE**

ANEXO 10.1. Curvas de calibración y límites de detección de los BTEX's e hidrocarburos alifáticos, determinados en muestras de aire*.

Compuesto	Límite de detección, ppmv	m	b	R ²
<i>n</i> -Hexano	0.6	215	-93	0,998
Benceno	0.3	983	1095	0,997
Ciclohexeno	0.4	544	-579	0,996
<i>n</i> -Heptano	1	405	-272	0,996
Tolueno	0.4	1744	-2128	0,992
Etilbenceno	0.4	3735	-2171	-0,998
<i>o</i> -Xileno	0.3	5134	-2221	0,999
(<i>p</i> - + <i>m</i> -) Xilenos	0.2	4111	-1844	0,998

* $Y = m(X) + b$; Y= área; m = pendiente; X = concentración (ppmv); b = intercepto.



Anexo 10.2. Perfil cromatográfico típico de los compuestos en el aire al interior de la fábrica de calzado aislados por HS-SPME (PDMS, 100 mm) y analizados por HRGC-FID, utilizando la columna capilar HP-FFAP [Poli(etilenglicol) ligado y entrecruzado, modificado] de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.52 mm (f.e.). 1- *n*-Hexano; 2- Tolueno; 3- Etilbenceno; 4- *p*-Xileno; 5- *m*-Xileno; 6- *o*-Xileno.

