

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA SEDE VIÑA DEL MAR -
JOSÉ MIGUEL CARRERA**

**Estudio de estabilidad de análisis de tolueno en muestra
de orina bajo condiciones de tiempo y temperatura pre
fijadas.**

Trabajo de Titulación para
optar al Título de Técnico
Universitario en QUÍMICA,
MENCIÓN QUÍMICA
ANÁLITICA

Alumno:

Karina Saavedra Caba

Profesor Guía:

Gonzalo Sepúlveda Ramírez

Profesor Correferente:

Miguel Zazopulos Garay

RESUMEN

KEYWORDS: ESTABILIDAD DE TOLUENO, COVS, ORINA, GC, HEADSPACE.

Para la determinación cuantitativa de los analitos en matrices biológicas, es fundamental controlar todos los procesos involucrados desde la toma de muestra hasta su procesamiento analítico, con el fin de garantizar la obtención de resultados válidos y representativos. En la práctica, la mayoría de estos análisis no son realizados inmediatamente, por lo tanto, para el LHI-IST es primordial considerar la estabilidad del compuesto químico en las etapas de recolección, manipulación, transporte y almacenamiento de la muestra.

El contenedor o sistema de recolección juega un rol importante en la estabilidad del analito en la muestra, sobre todo de aquellos con naturaleza volátil. En el ámbito ocupacional, la cuantificación de los compuestos volátiles orgánicos es de gran interés debido a la amplia utilización de estos en el área industrial. Si bien, hay normas nacionales e internacionales que establecen protocolos de toma de muestra de fluidos biológicos, existen pocas recomendaciones sobre los tipos de contenedores específicos para efectuar el muestreo de los volátiles orgánicos con la finalidad de disminuir factores como la evaporación, absorción, distribución no homogénea que afectan su integridad química y cuantificación final. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es estudiar la conservación de las muestras de orina, analizando la estabilidad del tolueno en tres tipos de sistema de recolección: frasco estéril plástico, el que actualmente se utiliza, frasco de vidrio con sello hermético, recomendado internacionalmente, y frasco estéril sellado al vacío con tubo vacutainer, el propuesto, bajo condiciones de tiempo y temperatura prefijadas.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizará un pool de orina libre de solventes, a la cual se le agregará una concentración conocida de tolueno. Para monitorear la estabilidad de tolueno, se simulan condiciones de transporte y almacenamiento, a una temperatura de 4°C y 18°C por un periodo de 7 días, determinando la concentración de tolueno al día 0,1, 3, 5 y 7 por cromatografía de gases asociada a headspace. Los resultados son analizados estadísticamente, para evaluar la pérdida de tolueno en la orina.

Al obtener los resultados de los análisis se considera que el contenedor C es el más apto para mantener estable el tolueno hasta el día 5 a 4°C, por lo tanto, se recomienda que, al realizar el análisis de tolueno en orina, esta se mantenga bajo cadena de frío previo análisis (4°C) y no pasen más de 5 días desde la toma de muestra hasta el análisis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN..... 1

OBJETIVOS..... 2

OBJETIVO GENERAL 2

OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 2

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO 3

1.1. ANTECEDENTES GENERALES..... 4

1.1.1 IST: 4

1.1.2. HIGIENE INDUSTRIAL..... 5

1.1.3 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLATILES 6

1.2 TOLUENO: 8

1.2.1 TOXICOCINÉTICA DE TOLUENO..... 9

1.2.2 MONITOREO BIOLÓGICO:..... 12

1.3 METODOLOGÍA ANALÍTICA 13

1.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES: 13

1.3.2 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO: 14

1.3.2.1 Gas portador:..... 15

1.3.2.2 Introducción de la muestra: 15

1.3.3 SISTEMA DE DETECCIÓN..... 23

1.3.3.1 Detector de conductividad térmica: 25

1.3.3.2 Detector de ionización por llama:..... 26

1.3.3.3 Detector de captura electrónica: 27

1.3.3.3 Detector de nitrógeno-fósforo. 29

1.3.3.4 Detector fotométrico de llama 30

1.3.3.5 Detector de fotoionización..... 32

CAPÍTULO 2: ETAPA EXPERIMENTAL 34

2.1 METODOLOGÍA: 35

2.1.1. FUNDAMENTO TEÓRICO: 35

2.1.2. EQUIPOS Y MATERIALES: 35

2.1.3 REACTIVOS:..... 36

2.2 PROCEDIMIENTO:..... 36

2.2.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS: 40

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES 42

3.1 RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 43

3.2 RECIPIENTE “A” A 4°C Y 18°C 46

3.3 RECIPIENTE “B” A 4°C Y 18°C 47

3.4 RECIPIENTE “C” A 4°C Y 18°C 48

3.5 INFLUENCIA DEL TIEMPO Y TEMPERATURA PARA LOS CONTENEDORES A Y C..... 49

3.5.1 BAJA DE ÁREAS RESPECTO AL DIA 0 A 4 ° C..... 49

3.5.2 BAJA DE ÁREAS RESPECTO AL DIA 0 A 18 ° C 50

3.5.3. INTERPRETACION DIAGRAMA DE CAJAS Y BIGOTES 52

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 53

BIBLIOGRAFÍA.....54

ANEXOS 56

ANEXO A: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A1 a 4°C 57

ANEXO B: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A2 a 4°C 57

ANEXO C: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B1 a 4°C..... 57

ANEXO D: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B2 a 4°C 57

ANEXO E: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C1 a 4°C 58

ANEXO F: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C2 a 4°C 58

ANEXO G: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A3 a 18°C 58

ANEXO H: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A4 a 18°C 58

ANEXO I: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B3 a 18°C..... 59

ANEXO J: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B4 a 18°C..... 59

ANEXO K: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C3 a 18°C..... 59

ANEXO L: CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C4 a 18°C 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Molécula de Tolueno 9

Figura 1-2. Vías enzimáticas implicadas en el metabolismo del tolueno. 11

Figura 1-3. Aparatos para cromatografía de gases 15

Figura 1-4. Esquema de inyector para columnas empaquetadas 16

Figura 1-5. Esquema de un inyector de "split" 18

Figura 1-6. Esquema de un inyector "on-column" 20

Figura 1-7. Esquema de una válvula de inyección de gases 21

Figura 1-8. Esquema de un inyector de desorción térmica 21

Figura 1-9. Sistemas de inyección de espacio de cabeza. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1-10. Cromatografía integral y diferencial 23

Figura 1-11. Esquema de un detector de conductividad térmica.....	26
Figura 1-12. Circuito simplificado de un detector de ionización por llama.	26
Figura 1-13. Detector de ionización por llama	27
Figura 1-14. Detector de captura electrónica tipo concéntrico.....	28
Figura 1-15. Detector de nitrógeno-fosforo	30
Figura 1-16. Esquema de un detector fotométrico de llama	31
Figura 1-17. Detalle de un doble quemador	31
Figura 1-18. Detector de fotoionización	32
Figura 2-1. Procedimiento para 4°C	37
Figura 2-2. Procedimiento para 18°C	38
Figura 2-3. Imágenes de procedimiento. (a) Recipientes a evaluar. (b) Viales headspace. (c) Matraz con orina para homogeneizar. (d) Preparación de muestras para luego llevar a la temperatura indicada	40
Figura 3-1. Diagrama de cajas y bigotes. (a) Áreas obtenidas del recipiente A a 4°C desde el día 0 al día 7. (b) Áreas obtenidas del recipiente C a 4°C desde el día 0 al día 7	52
Figura 3-2. Diagrama de cajas y bigotes. (a) Áreas obtenidas del recipiente A a 18°C desde el día 0 al día 7. (b) Áreas obtenidas del recipiente C a 18°C desde el día 0 al día 7.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Propiedades físicas y químicas de tolueno	9
Tabla 1-2. Absorción toxicocinética de tolueno	10
Tabla 1-3. Monitoreo biológico para tolueno	12
Tabla 1-4. Monitoreo biológico para tolueno (continuación)	13
Tabla 2-1. Contenedores a evaluar	35
Tabla 2-2. Orden de análisis	38
Tabla 2-3. Condiciones cromatográficas del horno	40
Tabla 2-4. Condiciones cromatográficas del horno (continuación).....	41
Tabla 2-5. Condiciones cromatográficas de la columna	41
Tabla 2-6. Condiciones cromatograficas del headspace	41
Tabla 3-1. Resumen de resultados obtenidos a 4°C.....	43
Tabla 3-2. Resumen de resultados obtenidos a 18°C.....	44
Tabla 3-3. T de student comparativo entre recipientes del mismo tipo para A.....	45
Tabla 3-4. T de student comparativo entre recipientes del mismo tipo para C	45
Tabla 3-5. Resultados estadísticos para recipiente A a 4°C	46
Tabla 3-6. Resultados estadísticos para recipiente A a 18°C	47
Tabla 3-7. Resultados estadísticos para recipiente B a 4°C	48
Tabla 3-8. Resultados estadísticos para recipiente B a 18°C	48
Tabla 3-9. Resultados estadísticos para recipiente C a 4°C	49
Tabla 3-10. Resultados estadísticos para recipiente C a 18°C.	49
Tabla 3-11. Baja de área respecto al día 0 a 4°C.	50
Tabla 3-12. Baja de áreas respecto al día 0 a 18°C.....	50
Tabla 3-13. Prueba T de student para dos muestras emparejadas a 4 °C (recipientes A y C)	51
Tabla 3-14. Prueba T de student para dos muestras emparejadas a 18°C (recipiente A y C)	51

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

SIGLAS

AEPT	: Altura equivalente del plato teórico
ECD	: Electron Capture Detector (Detector de captura de electrones)
EDTA	: Ácido etilendiamintetraacético
EPA	: Environmental Protection Agency (Agencia de protección ambiental de Estados Unidos)
CYP	: Citocromo p-450
Cov	: Compuesto orgánico volátil
Covs	: Compuestos orgánicos volátiles
GC	: Gas Chromatography (Cromatografía de gases)
GC-MS	: Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatógrafo de Gases acoplado a un espectrómetro de masas)
FID	: Flame Ionization Detector (Detector de ionización de llama)
FPD	: Flame Photometric Detector (Detector fotométrico de llama)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HS	: Headspace
IST	: Instituto de Seguridad del Trabajo
LHI	: Laboratorio Higiene Industrial
NIOSH	: National Institute for Occupational Safety and Health (Instituto nacional para la salud y seguridad ocupacional)
NPD	: Nitrogen-Phosphorus Detectors (Detector nitrógeno-fosforo)
OMS	: Organización Mundial de la Salud
Ppbv	: Partes por billón en volumen
PVC	: Policloruro de vinilo
TNT	: Trinitrotolueno
UV	: Ultravioleta

SIMBOLOGÍAS

β	: Beta
cm	: Centímetros
eV	: Electrovoltio
g	: Gramos

°C	: Grados Celsius
hrs	: Horas
L o l	: Litro
µg	: Microgramo
µmol	: Micromol
min	: Minutos
ml	: Mililitros
mg	: Miligramo
mm	: Milímetros
mol	: Cantidad de sustancia
mv	: Milivoltio
nm	: Nanómetro
µL	: Microlitro
ng	: Nanogramo
nmol	: Nanomol
psi	: Pounds-force per Square Inch (Libra de fuerza por pulgada al cuadrado)
p.a	: Para análisis
%	: Porcentaje
Seg	: Segundos
T°	: Temperatura
t cal	: t calculado
t crit	: t cr

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la OMS, la salud ocupacional es una actividad multidisciplinaria, dirigida a promover y proteger la salud de los trabajadores mediante la prevención y el control de enfermedades y accidentes, e involucra la eliminación de los factores y condiciones que ponen en peligro la salud y la seguridad en el trabajo, por esta razón, el departamento de laboratorio higiene industrial del instituto de salud del trabajador está comprometido con realizar mejoras en análisis de Covs.

Cuando una sustancia como el tolueno se libera desde un área extensa, por ejemplo, desde una planta industrial, o desde un recipiente como un barril o una botella, la sustancia entra al ambiente.

Una preocupación seria de salud respecto al tolueno es que puede tener un efecto sobre el sistema nervioso (cerebro y nervios), estos efectos pueden ser temporales, como dolores de cabeza, mareos o pérdida del conocimiento, sin embargo, los efectos como la falta de coordinación, el deterioro cognitivo y la pérdida de visión y audición pueden volverse permanentes con la exposición repetida.

Al superar los límites de tolueno en el ambiente laboral, se realizan exámenes bioquímicos a los trabajadores expuestos, la problemática en LHI-IST, recae en los resultados de los análisis realizados, ya que, estos se encuentran bajo la curva de calibración, es decir, como si los trabajadores expuestos no presentaran tolueno en el organismo, esto puede ser debido a la estabilidad del compuesto analizado.

En esta investigación se compone de tres capítulos: el capítulo 1 trata de “Antecedentes generales”, el capítulo 2 de la “Etapa experimental”, y el capítulo 3 de los “Resultados y discusiones”. Donde se pretende realizar un estudio de estabilidad de tolueno en orina, llevando a cabo un análisis estadístico en función de los parámetros establecidos. Se utiliza una muestra de orina a la cual se le agrega una concentración de tolueno conocida, la cual es introducida en el equipo de cromatografía gaseosa acoplada a headspace entregando sus respectivos cromatogramas; dejando pendiente otros estudios de solventes orgánicos volátiles, así también, otras interferencias posibles.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Analizar la estabilidad del compuesto orgánico volátil tolueno, en muestra de orina bajo condiciones pre fijadas en diferentes contenedores de muestreo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Establecer los parámetros a evaluar para determinar la estabilidad del analito.
- ❖ Evaluar influencia de temperatura y tiempo en la estabilidad del tolueno.
- ❖ Evaluar influencia del recipiente en la estabilidad del tolueno.
- ❖ Realizar estudio estadístico en función a los parámetros establecidos.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 IST:

El Instituto de Seguridad del Trabajo es una corporación de carácter Mutua, que tiene por fin administrar, sin fines de lucro, el Seguro Social contra Riesgos de Accidentes del Trabajo y Enfermedades Profesionales, de acuerdo a las disposiciones de la Ley n° 16.744, respecto de sus empresas adherentes y de sus trabajadores afiliados.

Sus actividades como prestaciones y acciones preventivas son controladas por la Superintendencia de Seguridad Social.

❖ Prestaciones:

- Económicas: producidas por incapacidad, invalidez o muerte.
- Prevención de riesgos: Apoya las actividades de prevención de riesgos en el interior de las empresas adherentes, para mejorar los estándares de seguridad, el control de pérdidas, el cuidado del medio ambiente y la calidad de vida de los trabajadores.
- Prestaciones médicas: El trabajador accidentado o enfermo profesional tiene derecho a las prestaciones médicas necesarias que se le otorgarán gratuitamente hasta su curación completa o mientras subsistan los síntomas de las secuelas causadas por enfermedad o accidente laboral.

❖ Acciones preventivas: son todas las actividades y acciones tendientes a evitar y controlar la ocurrencia de accidentes del trabajo y enfermedades profesionales en las empresas adherentes y se dividen en las siguientes disciplinas:

- Seguridad industrial: Su tarea es diagnosticar las causas de los accidentes en los ambientes de trabajo y aplicar, en conjunto con las empresas, los productos preventivos diseñados para controlarlas, evitando con ello la ocurrencia de nuevos accidentes del trabajo
- Salud ocupacional: Evalúa y controla los factores de riesgo presentes en el ambiente laboral, para prevenir las enfermedades y accidentes de trabajo, junto con el agravamiento de las enfermedades preexistentes. También se ocupa de promover el bienestar y capacitar a los trabajadores en la adaptación a sus labores
- Ergonomía: La ergonomía elimina las barreras que se oponen a un trabajo seguro, productivo y de calidad mediante el adecuado ajuste de productos,

tareas y ambientes a la persona. Los ergónomos contribuyen al diseño y evaluación de tareas, trabajos, productos, ambientes y sistemas, en orden de hacerlos compatibles con las necesidades, habilidades y limitaciones de las personas. El enfoque ergonómico pone las necesidades y capacidades humanas como el foco del diseño de sistemas tecnológicos. Su propósito es asegurar que los humanos y la tecnología trabajen en completa armonía. ^[12]

1.1.2. HIGIENE INDUSTRIAL

Consiste en reconocer, evaluar y controlar en conjunto con la empresa, los riesgos de contraer una enfermedad profesional como consecuencia del ejercicio del trabajo. Este proceso incluye:

- ❖ Identificar los peligros higiénicos (agentes) existentes en un área, recinto, proceso y/o tarea.
- ❖ Identificar los diferentes ambientes de trabajo (puestos de trabajo en contacto con el agente) o grupos homogéneos de riesgo.
- ❖ Identificar los tiempos de contacto (tiempos de exposición, ciclos de exposición).
- ❖ Identificar la intensidad del contacto en esos tiempos (niveles, concentración).
- ❖ Evaluar si la exposición al agente tiene el potencial de provocar una enfermedad profesional.
- ❖ Definir las mejores alternativas para mantener controlado el riesgo.
- ❖ Verificar que las alternativas seleccionadas cumplan su cometido. ^[12]

1.1.2.1 Laboratorio higiene industrial:

Contribuye a la identificación y evaluación de los contaminantes que puedan existir en los ambientes de trabajo y la salud ocupacional de las empresas adherentes de manera confiable y oportuna, realizando análisis tales como gravimetría de polvo total o fracción respirables capturados en filtros de PVC, metales en sangre-orina, Cows, entre otros.

Este laboratorio está ubicado en Viña del Mar desde inicios de la década del '70 y pionero en materia de Higiene Industrial, permite dar soporte, desde Arica a Punta Arenas, a las quince mil empresas que son adherentes al IST, y cuenta con personal altamente calificado y equipos de última generación. ^[4]

1.1.3 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLATILES

Los Covs son sustancias químicas, de origen natural (metano, por ejemplo) o bien artificial (origen en la industria) ^[15], que se presentan en estado gaseoso a la temperatura ambiente normal o que son muy volátiles a dicha temperatura.^[13] Contienen carbono, pero también otros elementos como el hidrógeno, el oxígeno, el flúor, el cloro, el bromo, el azufre o el nitrógeno;^[1,14] formando compuestos tales como, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos clorados; aldehídos, cetonas, éteres, ácidos y alcoholes.^[15] Los más abundantes en el aire son: metano, tolueno, n-butano, i-pentano, etano, benceno, n-pentano, propano y etileno.

Los Covs se originan por gasificación o por evaporación de sustancias derivadas del petróleo o de otras sustancias orgánicas. Son compuestos precursores del ozono y del material particulado fino.^[16]

Se estima que las personas pasamos de entre un 80% y un 90% de nuestro tiempo en espacios interiores. Espacios en los que podemos estar expuestos a agentes contaminantes que provienen del propio edificio, como emisiones de los materiales en paredes, suelos y techos, o del mobiliario, de los equipos informáticos y de otros equipos de oficina o de los productos de limpieza utilizados.^[17]

Los Covs son contaminantes del aire y cuando se mezclan con óxidos de nitrógeno, reaccionan para formar ozono (a nivel del suelo o troposférico). La presencia de concentraciones elevadas de ozono en el aire que respiramos es muy peligrosa, también participan activamente en numerosas reacciones, en la troposfera y en la estratosfera, contribuyendo a la formación del smog fotoquímico y al efecto invernadero.

Casi una cuarta parte de los compuestos orgánicos volátiles emitidos a la atmósfera proviene del uso de disolventes, tanto en el ámbito industrial, donde abarcan la práctica totalidad de los sectores industriales, como en el doméstico. El resto de los Covs emitidos tienen origen antropogénico (transporte y producción de energía eléctrica por combustión) y natural (vegetación y animales salvajes y domésticos).^[18]

Algunas fuentes de contaminación son productos para el hogar, estos pueden ser removedores de pintura, pinturas y otros solventes, conservantes de la madera, aerosoles, limpiadores, desinfectantes y otros. Todos estos productos pueden liberar compuestos orgánicos mientras se usan, y, en cierto grado, cuando se almacenan.^[17]

❖ Efectos en el ambiente:

Las emisiones que podemos encontrar en un centro de trabajo pueden ser de dos tipos: emisiones puntuales y emisiones difusas.

- Emisiones puntuales: son aquellas que tienen una salida a la atmósfera localizada. Es decir, suelen tener un punto concreto por donde salen a la atmósfera, como puede ser una chimenea, una torre de humos, etc. Al estar localizadas, estas emisiones son fácilmente controlables y medibles. Se habla entonces de focos fijos cuando nos referimos a aquellos puntos por donde salen las emisiones de una industria a la atmósfera.
- Emisiones difusas: son emisiones no localizadas (no salen por una chimenea), y por ello son difíciles de controlar, como por ejemplo los vapores o emanaciones de gases ocasionados por fugas, derrames, manipulación de sustancias, etc., que antes de salir a la atmósfera se propagan por el interior de las instalaciones. ^[13]

Los Covs pueden tener diferentes efectos directos o indirectos sobre la salud y el medio ambiente: Efectos nocivos debido a su toxicidad, efectos carcinógenos, desperfectos sobre los materiales, olores, etc. Pero el principal problema ambiental es su participación activa en numerosas reacciones, en la troposfera y en la estratosfera, contribuyendo a la formación del smog fotoquímico y al desequilibrio del efecto invernadero, además son precursores del ozono troposférico. ^[14]

❖ Efectos para la salud:

Los efectos de los compuestos orgánicos volátiles para la salud pueden variar mucho según el compuesto y comprenden desde un alto grado de toxicidad hasta ausencia de efectos conocidos. Esos efectos dependerán de la naturaleza de cada compuesto y del grado y del período de exposición al mismo.

Algunos Covs son muy tóxicos, como el benceno, el óxido de estireno, el percloroetileno o el tricloroetileno, que son cancerígenos, o el formaldehído y el estireno, que además son disruptores endocrinos. ^[13]

La extensión y la naturaleza del efecto sobre la salud dependerá de muchos factores, incluyendo el nivel de exposición y la duración del tiempo de exposición. ^[19]

La exposición a largo plazo a los Covs puede causar lesiones del hígado, los riñones y el sistema nervioso central.

La exposición a corto plazo puede causar irritación de los ojos y las vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, fatiga, pérdida de coordinación, reacciones alérgicas de la piel, náusea y trastornos de la memoria. ^[13]

1.2 TOLUENO:

Compuesto orgánico volátil también conocido como metilbenceno, debido a su fórmula estructural (ver figura 1-1.), es la principal materia prima a partir de la cual se obtienen otras sustancias y productos derivados del benceno como, por ejemplo, el ácido benzoico, el fenol, la sacarina, medicamentos, colorantes, perfumes, TNT y detergentes.

A temperatura y presiones ordinarias, se presenta en un estado líquido e incoloro con un olor similar a los disolventes de pintura, y se caracteriza por ser miscible con la mayoría de disolventes orgánicos no polares, sin embargo, es casi inmiscible con el agua. Presenta un punto de fusión de -95°C y un punto de ebullición de 111°C (ver tabla 1-1.).

Químicamente se genera por la ciclodehidrogenación del n-heptano en presencia de catalizadores, aunque también se obtiene como subproducto en el proceso de formación de etileno y propeno. ^[2]

Puede ser liberado al aire, al agua y al suelo, en lugares donde se produce o se usa. Se encuentra comúnmente en el aire, especialmente cuando hay mucho tráfico de vehículos. Datos de monitoreo del aire libre en los Estados Unidos demuestran que está presente en niveles promedio que va de 1 a 35 ppbv. Muestras de aire puertas adentro pueden tener niveles de este analito más altos en lugares donde se usan productos tales como diluyentes de pintura, solventes, o productos de tabaco.

Además, puede entrar a aguas de superficie y al agua subterránea (pozos) cuando se derraman solventes o productos de petróleo. También puede filtrarse desde tanques de almacenamiento bajo tierra en gasolineras y otras facilidades. Cuando productos que contienen este compuesto se colocan en vertederos o sitios de desechos, éste puede pasar al suelo y al agua cerca del sitio. Puede ser degradado en agua bajo la superficie principalmente por microorganismos anaeróbicos. Por otro lado, se evaporará fácilmente al aire o será degradado por microorganismos en aguas de superficie. En el caso de tanques de almacenamiento bajo tierra con escapes pueden contaminar el suelo con tolueno y otros productos de petróleo. En la superficie del suelo se evapora rápidamente al aire y en el suelo es degradado rápidamente a otras sustancias químicas por microorganismos. ^[3]

Es considerado una sustancia nociva para el ser humano, aunque su toxicidad es muy inferior a la que presenta el benceno. La razón radica en que el citocromo P-450, responsable de la metabolización del benceno y del tolueno, oxida preferentemente el grupo metilo y los epóxidos generados de la oxidación del anillo aromático (que le atribuye el poder cancerígeno del benceno).

La exposición a grandes concentraciones puede provocar afecciones en el sistema nervioso de la persona, y a bajas y moderadas dosis se producen síntomas de cansancio, confusión,

debilidad, pérdida de memoria, náuseas, pérdida del apetito y de vista. No obstante, la sintomatología generalmente desaparece cuando no existe exposición a la sustancia.

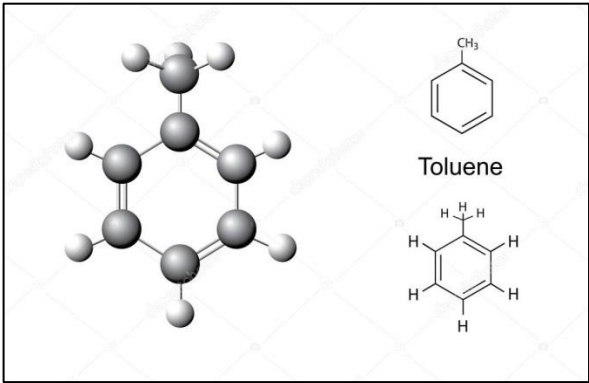
Los vapores del compuesto orgánico presentan un ligero efecto narcótico e irritan los ojos. Su inhalación durante un período breve de tiempo puede provocar que la persona sufra mareos, e incluso si la cantidad es muy elevada, que pierda el conocimiento.

Respecto a su afección sobre el medio ambiente, es considerado biodegradable por ciertos microorganismos, sin embargo, en grandes cantidades, presenta una cierta toxicidad sobre la vida acuática y por lo tanto es catalogado como sustancia peligrosa. [2]

Tabla 1-1. Propiedades físicas y químicas de tolueno

Formula química	C ₇ H ₈ , C ₆ H ₅ -CH ₃
Composición	C: 91,25 %, H: 8,75 %
Peso molecular	92,13 g/mol
Densidad	0,867 g/ml
Punto de ebullición	111°C
Punto de fusión	-95 °C

Fuente: elaboración propia basada en registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes [2].



Fuente: Fórmulas estructurales y química modelo de la molécula de tolueno [18]

Figura 1-1. Molécula de Tolueno

1.2.1 TOXICOCINÉTICA DE TOLUENO

La toxicocinética es la rama que estudia los cambios de una sustancia en el organismo a través del tiempo [8], viendo qué sucede con ella dentro del mismo, en función de la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de la sustancia. [10]

❖ Absorción

La absorción es el paso de una sustancia del medio ambiente al organismo. Existen diferentes

tipos de rutas de depósito y absorción ^[11] ver Tabla 1-2.

Tabla 1-2. Absorción toxicocinética de tolueno

Por inhalación	Dermal	Vía gastrointestinal
Se estima que la absorción de tolueno es del 40-60% de la cantidad total inhalada.	El tolueno se puede absorber como un líquido y un vapor a través de la piel; la contribución de la absorción dérmica de vapor de tolueno a la carga corporal es del 1-2%	La captación vía gastrointestinal es completa.

Fuente: HBM Biological Application Data Sheet, 2010^[6]

❖ Distribución:

El tolueno se distribuye por el cuerpo humano rápidamente. De acuerdo con la revisión toxicológica de tolueno de la EPA, se acumula más tolueno en el cerebro que en el hígado después de la exposición por inhalación, mientras que después de la exposición oral, el hígado contiene las mayores concentraciones de tolueno. ^[7]

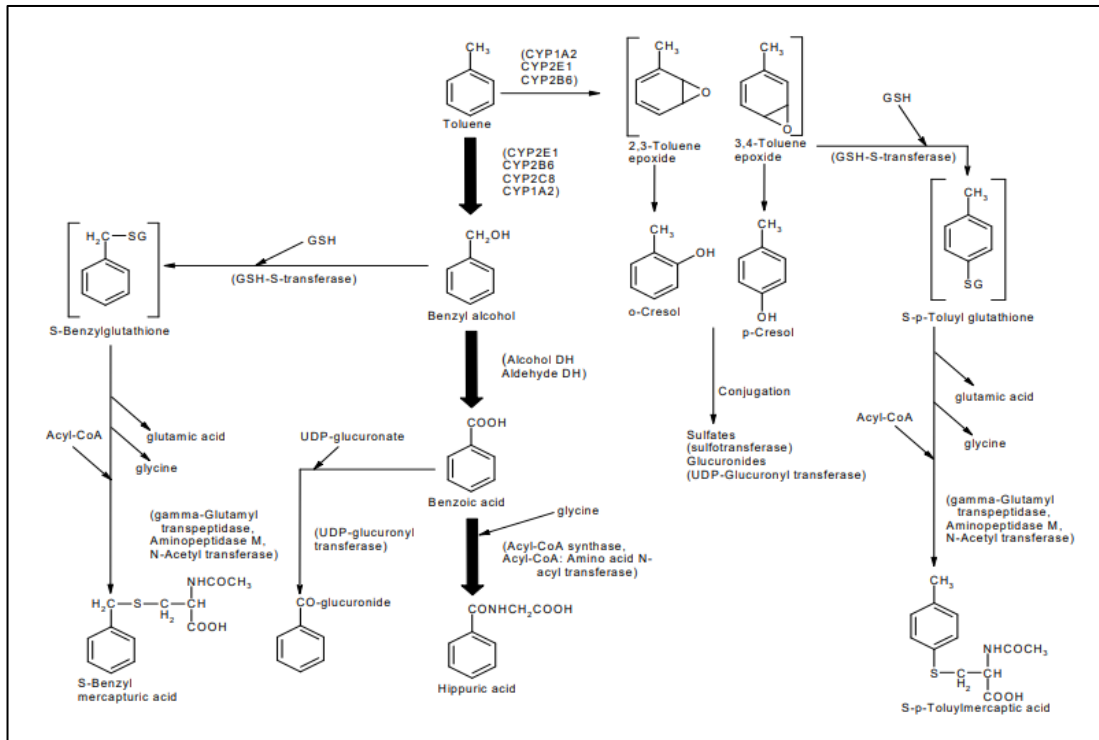
A estos le siguen la medula ósea, las glándulas suprarrenales, los riñones, el hígado y la sangre. ^[6]

❖ Metabolismo:

Las principales vías enzimáticas implicadas en el metabolismo del tolueno se muestran en la Figura 1-2.

El paso inicial en el metabolismo del tolueno es la transformación por enzimas del CYP, que se produce principalmente en el hígado.

El tolueno se metaboliza por hidroxilación secuencial y oxidación a ácido benzoico. La conjugación de la glicina con ácido benzoico para formar ácido hipúrico constituye la ruta principal de tolueno desintoxicación y eliminación.



Fuente: EPA, toxicological review of toluene^[7]

Figura 1-2. Vías enzimáticas implicadas en el metabolismo del tolueno. 1

Una vía menos relacionada con CYP implica la epoxidación transitoria del anillo aromático para formar ya sea orto o paracresol. Los cresoles pueden experimentar una variedad de reacciones de conjugación, formando principalmente sulfatos y glucurónidos. La conjugación de glutatión también puede ocurrir, dando como resultado S-bencilglutatión y ácido S-bencilmercaptúrico (conjugación con alcohol bencílico), o S-p-toluido glutatión y ácido S-p-toluyilmercaptúrico (conjugación al anillo epoxidado).^[7]

❖ Eliminación:

El 20 % del tolueno absorbido es excretado vía oral sin cambios.^[6]

Por otra parte, la mayoría del tolueno se elimina en la orina principalmente como metabolitos. el principal metabolito urinario del tolueno es el ácido hipúrico, seguido en menor cantidad por los mencionados anteriormente.^[7]

El ácido hipúrico ha sido el más popular analito para el control biológico de la exposición a tolueno, pero debido a su corta vida media se cambió por el análisis del tolueno mismo en la orina ya que es un mejor marcador de exposición.^[19]

Respecto al tolueno en la sangre, este se elimina en tres fases a los 3, 40 y 738 min luego de la exposición.^[7]

1.2.2 MONITOREO BIOLÓGICO:

El Monitoreo Biológico, consiste en la realización de estudios paraclínicos para determinar la concentración corporal de distintos agentes químicos a los cuales un trabajador se encuentra expuesto.

La detección y cuantificación del agente químico al que los trabajadores están expuestos permite establecer medidas de corrección, seguimiento y según el resultado el abandono o no de las actividades desempeñadas por el trabajador. ^[12]

El monitoreo biológico para el agente tolueno se observa en la tabla 1-3.

Tabla 1-3. Monitoreo biológico para tolueno

	BIOMARCADORES			
	TOLUENO EN SANGRE	O-CRESOL EN ORINA	ACIDO HIPURICO EN ORINA	TOLUENO EN AIRE EXHALADO
MATERIAL BIOLOGICO	sangre	Orina	orina	aire alveolar
TIPO DE MUESTRA	sangre pura	mancha de orina	mancha de orina	aire exhalado
ESTRATEGIA DE MUESTREO	<24 hrs	<24 hrs	<24 hrs	1-2 días
PATRON DE EXCRECION	eliminación trifásica en sangre: 3 min, 40 min y 12,3 hrs. Vida media en sangre: 21,2 hrs	eliminación monofásica con una vida media de 7,4 +- 2,3 hrs	eliminación monofásica con una vida media de 74 min en mujeres y 117 min en hombres.	eliminación monofásica de 25 min. Termino de vida media en aire alveolar: 18,7 hrs.
MATERIALES	jeringas que contienen EDTA o heparina (anticoagulantes)	contenedor universal de polietileno	contenedor universal de polietileno	Bio-VOC, tenax TA-tubes
TRANSPORTE	4°C	4°C	4°C	Temperatura ambiente
ALMACENAMIENTO	(-20° C)	4°C por 5 días -20°C	(-20° C)	<2 h de transferencia a TENAX preferiblemente sellado en una bolsa de plástico para evitar el contacto con el aire ambiente

Fuente: elaboración propia basada en registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes ^[2].

Tabla 1-4. Monitoreo biológico para tolueno (continuación)

ESTABILIDAD	-	4°C por 5 días -20°C: 1 Día	A 4°C por una semana A -20°C por 2 meses A T° ambiente por un día	> 1 mes
PRINCIPIO DE MEDICION	cromatografía gaseosa, headspace	*GC-MS después de la hidrólisis y la extracción con disolvente *HPLC-UV de fase inversa *GC-MS *GC/ECD capilar	*espectrometría de absorción visible *cromatografía de iones *HPLC	cromatografía de gases: detector de ionización de llama (GC-FID) o GC-EM
ALICUOTAS	5 ml	5 ml	50-100 ml	100-200 ml
LIMITE DE CUANTIFICACION	35 ng/L (límite de detección)	< 5 µg/L (límite de detección) 0,05 mg/L orina (Capilar GC/ECD)	0,002 g/L (límite de detección)	0,01 nmol/L
FACTOR DE CONVERSION	1 mg/L = 0,011 nmol/L 1 nmol/L = 92,1 mg/L	1 µg/L = 5,58 * 10 ⁻³ µmol/L 1 µg /g creatinina= 0,63 µmol/ mol creatinina	1 µg/L = 5,58 * 10 ⁻³ µmol/L 1 µg /g creatinina= 0,63 µmol/ mol creatinina	1 nmol/L = 92,1 mg/L
VALOR DE EXPOSICION BIOLOGICA (US) BEI	0,05 mg/L (antes del último turno de la semana de trabajo)	0,5 mg/L (fin del turno)	1,6 g/g creatinina (fin del turno)	-
POSIBLES FACTORES DE CONFUSION	tabaquismo activo, exposición ocupacional	tabaquismo activo, exposición ocupacional	no es específico para tolueno, posible interferencia de la dieta, p. E210	tabaquismo activo, exposición ocupacional

Fuente: elaboración propia basada en registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes ^[2].

1.3 METODOLOGÍA ANALÍTICA

1.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES:

La cromatografía de gases es una técnica analítica utilizada en la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla.

Se basa en la diferencia de velocidades de migración que presentan los componentes de una mezcla, al ser arrastrados por un gas inerte, a través de un tubo relleno de un material adecuado denominado fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un líquido disperso sobre

un sólido inerte, entonces se tiene la llamada "cromatografía gas-líquido" y si la fase estacionaria es un sólido activo, se habla de "cromatografía gas-sólido".

Mediante esta técnica se pueden analizar muestras gaseosas, líquidas y sólidas que se vaporicen a temperaturas por debajo de 0°C hasta 450°C y para cualquier sustancia que pueda calentarse dando una presión de vapor de unos 30 mm de mercurio sin descomponerse. ^[9]

❖ Ventajas del método:

- Rapidez: un análisis completo puede durar entre 5 y 20 min.
- Versatilidad: las separaciones se pueden modificar notablemente según la fase estacionaria escogida y las condiciones cromatográficas empleadas.
- Simplicidad: para operar un cromatógrafo no se requiere un conocimiento avanzado de la teoría, pero si se deben poseer ciertos conocimientos básicos a objeto de obtener el máximo provecho del equipo.
- Sensibilidad: con ciertos detectores es posible detectar partes por billón y las cantidades de muestra inyectada pueden ser menores a 1 microlitro.

❖ Desventajas del método:

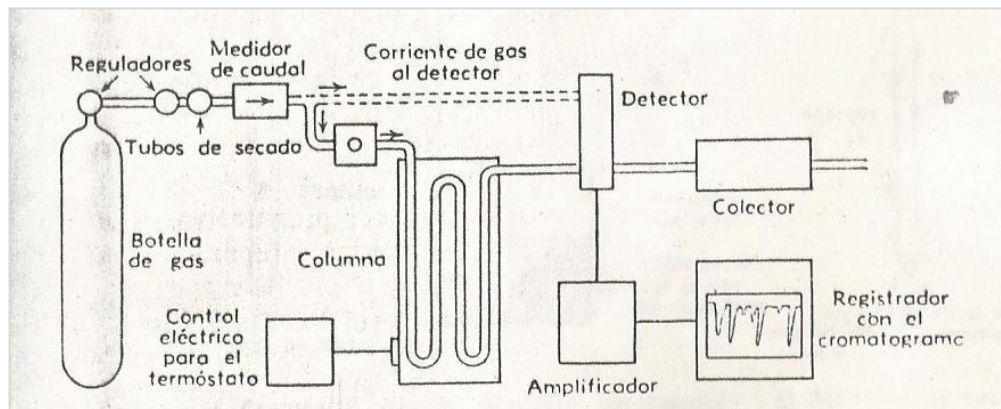
- La muestra debe ser volátil.
- Requerimiento de instrumentación especial para confirmar la identidad de los componentes.
- Se requiere de entrenamiento para técnicas especiales.
- Algunos compuestos no pueden ser utilizados:
 - Compuestos de peso molecular alto (600)
 - Compuestos iónicos -sales y compuestos muy polares y no volátiles, como azúcares, aminoácidos y nucleótidos.

1.3.2 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO:

Los principales componentes de un cromatógrafo de gases (ver Figura 1-3.) son los siguientes:

- ❖ Cilindro de gas portador.
- ❖ Introducción de la muestra.
- ❖ Columna cromatográfica.
- ❖ Detectores.

❖ Sistema de registro o detección



Fuente: Introducción a la Cromatografía

Figura 1-3. Aparatos para cromatografía de gases

1.3.2.1 Gas portador:

Los gases portadores utilizados en cromatografía no afectan la separación, ya que no tienen ninguna influencia sobre los procesos de sorción-desorción o partición que se producen en la columna, por lo que no afectan a la selectividad de esta; de cualquier forma, los términos de difusión en la fase móvil de la ecuación de Van Deemter, si dependen de la naturaleza del gas portador, por lo que las curvas de AEPT serán ligeramente distintos para cada tipo de gas, lo que a su vez influirá sobre la velocidad óptima de la fase móvil y, en consecuencia sobre los tiempos de análisis. ^[5]

Los gases comunes usados son: hidrógeno, helio y nitrógeno. ^[9]

El portador debe cumplir con varios requisitos entre los cuales se tienen:

- ❖ Inerte: No debe reaccionar con la muestra.
- ❖ Pureza: No debe tener impurezas, pues éstas serían separadas y detectadas.
- ❖ Bajo costo: Debe ser fácil de conseguir y barato.
- ❖ Baja difusión: Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.

El flujo del gas portador es de suma importancia en la eficiencia de la columna. Este puede ser medido mediante un medidor de burbuja y un cronómetro, a la salida de la columna. ^[9]

1.3.2.2 Introducción de la muestra:

En esencia, los dispositivos de inyección de muestras para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

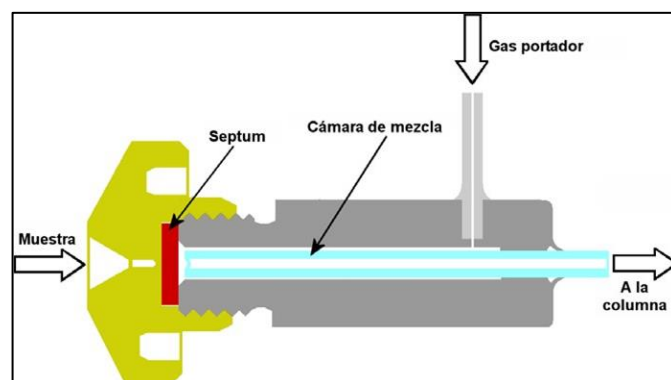
- La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
- La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
- La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.

[5]

❖ Inyectores para columnas empaquetadas.

La inyección de muestras en columnas empaquetadas no presenta problemas particulares; este tipo de columnas admiten cantidades de muestra relativamente elevadas, y la inyección de unos cuantos microlitros de muestra no conduce a una merma apreciable de la eficacia de la columna.

La mayoría de los cromatógrafos comerciales utilizan cámaras de inyección termostatzadas (ver figura 1-4.)



Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-4. Esquema de inyector para columnas empaquetadas

Básicamente, un inyector está formado por un bloque metálico, buen conductor del calor, provisto de un sistema de calentamiento, un termostato capaz de mantener su temperatura constante y un aislamiento térmico adecuado; en el interior de este horno, se encuentra alojado el sistema de inyección (ver figura 1-5). En éste, el gas portador, previamente calentado, pasa de forma continua por el sistema; la muestra es inyectada en el interior de la cámara, por medio de una micro jeringa de precisión, a través de un diafragma perforable (septum) con capacidad de autosellado en el momento en que se retira la aguja; una vez inyectada la muestra, ésta es vaporizada de forma instantánea, mezclándose con el gas portador en una cámara de mezcla (“líner”) construida de un material lo más inerte posible (acero inoxidable, níquel, vidrio o cuarzo). La muestra, una vez vaporizada, es arrastrada rápidamente por la corriente de gas portador en dirección a la columna.

El sistema de inyección de un cromatógrafo es un punto extremadamente crítico, y la utilización de una técnica de inyección inadecuada o una mala elección del sistema de inyección pueden echar a perder completamente la capacidad de separación de una columna.

Existen algunos tipos de inyectoros que permiten utilizar uno de los extremos de la columna cromatográfica como cámara de mezcla. La introducción de la muestra por medio de este tipo de inyectoros (inyección en columna), ofrece ventajas adicionales tales como permitir la utilización de temperaturas más bajas para la vaporización. ^[5]

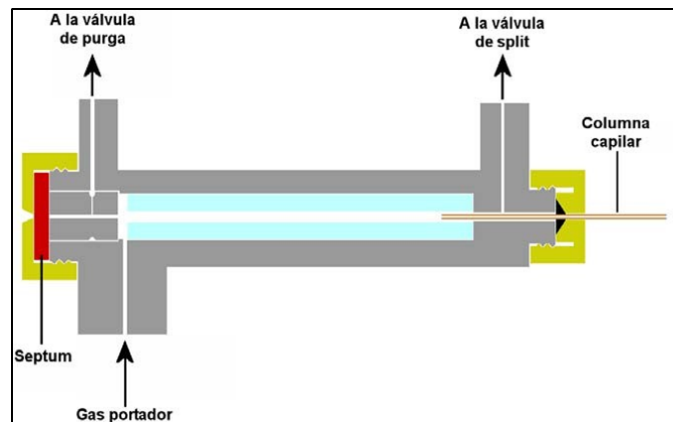
❖ Inyectoros para columnas capilares

Los sistemas de introducción de muestras utilizados para trabajar con columnas capilares, están basados sobre los mismos principios de los inyectoros utilizados para columnas empaquetadas, por lo que las consideraciones generales sobre ellos son iguales.

La diferencia fundamental entre los sistemas que utilizan columnas empaquetadas y los que utilizan columnas capilares, radica en que la cantidad de muestra que estas últimas pueden separar es mucho menor que en el primer caso; por otra parte, las columnas capilares son muy afectadas por los disolventes, de forma que los volúmenes que se pueden inyectar en ellas son extremadamente bajos. Dado que no existen jeringas capaces de medir con precisión volúmenes inferiores a 0,1 µl, los inyectoros utilizados para trabajar con este tipo de columnas, además de vaporizar la muestra y mezclarla con el gas portador, deberán ser capaces de introducir en la columna sólo una alícuota de la muestra total inyectada. Existen muchas más técnicas de inyección para columnas capilares que para columnas empaquetadas, y de entre ellas, se comentarán a continuación algunas de las más utilizadas.

- Inyección con división de muestra:

Este tipo de inyección (más conocida como inyección “split”), es el más sencillo de los que se utilizan en cromatografía capilar. El inyector de “split” (figura 2-3), consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto también la muestra vaporizada), se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducido en la columna. ^[5]



Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-5. Esquema de un inyector de "split"

Dado que en este tipo de inyectores la mayor parte del caudal del gas portador se dirige hacia la atmósfera, la válvula de “split” dispone de un sistema de apertura y cierre automáticos para que únicamente permita la salida de gas hacia la atmósfera durante el proceso de inyección. El control del flujo de gas portador que pasa a través de la columna, se realiza en este tipo de sistemas manteniendo constante la presión en la cámara de inyección, lo que permite que el caudal de gas que pasa a través del inyector pueda variar en función de que la válvula de “split” esté abierta o cerrada.

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes; en primer lugar, la división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas, por lo que los límites de detección aumentan bastante, lo que es un gran inconveniente a la hora de realizar análisis de trazas. Por otra parte, los inyectores de “split” pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra.

[5]

- Inyección “splitless”:

En la técnica de inyección “splitless”, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra inyectada, lógicamente condensa en la cabeza de la columna, actuando en este caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurrido un tiempo adecuado, se abre en el inyector una válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector; al mismo tiempo, se comienza un programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis.

Las utilizaciones de la técnica de “splitless” supone dos importantes ventajas. En primer lugar, dado que no existe división de muestra, permite un aumento notable de la sensibilidad, por lo que es muy adecuada para el análisis de trazas. Por otra parte, la reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna origina que las pérdidas de eficacia debidas a una inyección inadecuada sean de mucha menor importancia que en otras técnicas de inyección.

El diseño de un inyector “splitless” es básicamente el mismo que el del inyector de “split” (figura 1-6.), pudiéndose realizar la purga del inyector bien a través de la válvula de split, bien a través de una válvula de purga adicional situada cerca del septum. La mayoría de los inyectores de “split” comerciales, están diseñados para poder trabajar también en modo “splitless”. [5]

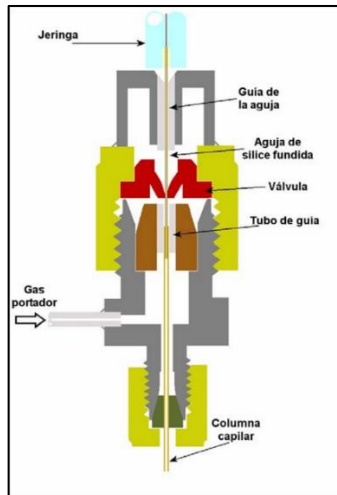
- Inyección en columna:

Ya se ha comentado que uno de los principales problemas de los sistemas de inyección utilizados con columnas capilares, es la posibilidad de discriminación entre los componentes de la muestra durante los procesos de vaporización de la muestra y paso de la muestra vaporizada a la columna. Evidentemente, la única forma de asegurarse de que la muestra que alcanza la columna se corresponde al 100 % con la muestra inyectada, es realizar la inyección directamente en la columna.

Los sistemas de inyección en columna (normalmente conocidos por su nombre inglés de “on-column”), han sido diseñados para posibilitar la introducción de muestras directamente en el interior de columnas capilares.

Es evidente que la introducción de una muestra por medio de una jeringa directamente en el interior de una columna capilar (de 0,23 mm de diámetro interno), requiere la utilización

de agujas extremadamente finas (suelen utilizarse agujas de sílice fundida de 0,15 mm de diámetro) que, en consecuencia, son incapaces de perforar un septum; la característica básica de un inyector “on-column” (figura 2-4), es la utilización de un sistema de válvulas y tubos de guía que permitan la introducción en el sistema de una aguja extremadamente fina. [5]



Fuente: cromatografía de gases ^[5]

Figura 1-6. Esquema de un inyector "on-column"

El método de trabajo utilizado en la inyección “on-column” recuerda en alguna forma al utilizado en la inyección “splitless”; la muestra es introducida directamente en la columna, manteniéndose ésta a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. Una vez introducida la muestra, se inicia el programa de calentamiento de la columna para proceder a la separación.

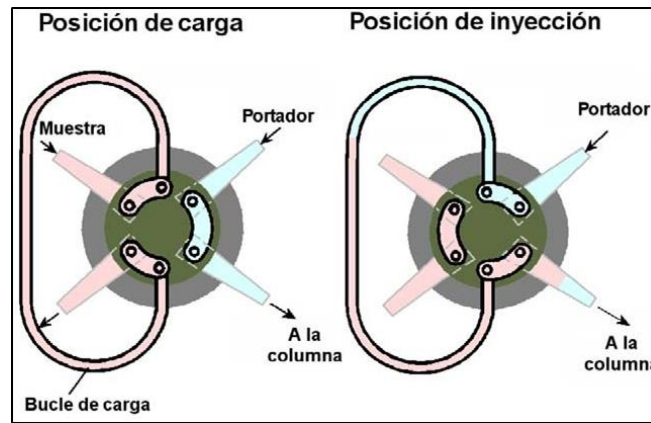
La gran ventaja que ofrece el sistema de inyección “on-column”, es que reduce la discriminación entre los componentes de la muestra prácticamente a cero, obviándose además todos los problemas que presentan las restantes técnicas de inyección. ^[5]

❖ Otros sistemas de inyección

Hasta el momento, se han descrito los sistemas de inyección utilizados tradicionalmente en cromatografía de gases, utilizado fundamentalmente para la introducción de muestras en disolución. Existen además otras técnicas de introducción de muestras, algunas de las cuales son de especial interés para el análisis de contaminantes ambientales; ejemplos de técnicas de inyección no convencionales pueden ser:

- Válvulas de inyección de gases:

La inyección por medio de válvulas, es muy utilizada para el muestreo automático de gases en sistemas dinámicos. Las válvulas muestreadoras utilizadas en cromatografía de gases son del tipo de seis vías y pueden estar provistas de bucles de carga de capacidad variable. El esquema de funcionamiento de este tipo de válvulas se muestra en la figura 1-7. ^[5]

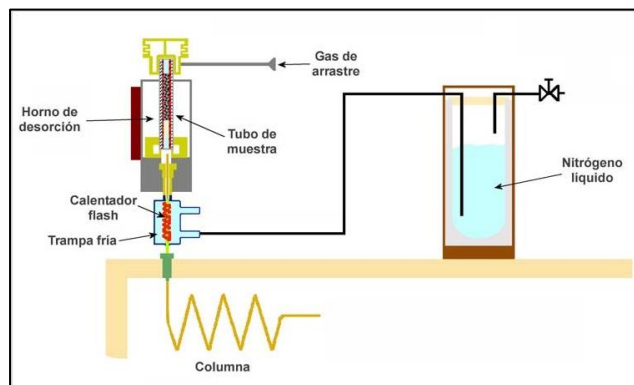


Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-7. Esquema de una válvula de inyección de gases

- Desorción térmica:

Básicamente, un equipo de desorción térmica (figura 1-8.), consta de un horno donde la muestra es desorbida de los tubos de muestreo a elevada temperatura bajo una corriente de gas portador; una vez desorbidos los vapores de la muestra, estos son retenidos en una trampa criogénica hasta la finalización del proceso de desorción, efectuándose la inyección en este momento por medio de un calentamiento muy rápido de la trampa fría.



Fuente: cromatografía de gases [5]

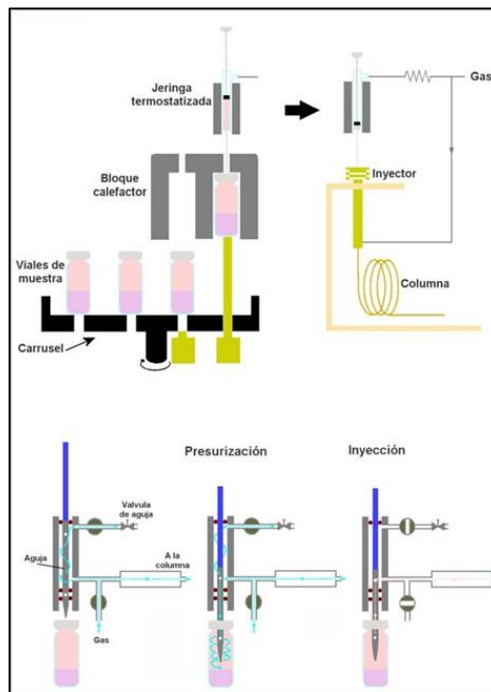
Figura 1-8. Esquema de un inyector de desorción térmica

Debe mencionarse que, al contrario de lo que sucede con la inyección de espacio de cabeza, la técnica de desorción térmica si permite realizar buenas cuantificaciones, siempre que se fijen unas condiciones adecuadas para asegurarse de que la desorción de la muestra es total.

- Inyectores de espacio de cabeza:

La técnica de análisis por espacio de cabeza es aplicable al análisis directo de contaminantes volátiles en muestras sólidas o líquidas. El fundamento de esta técnica consiste en analizar una alícuota de la atmósfera que se encuentra en contacto con la muestra con el fin de determinar en ella la fracción vaporizada de los componentes que se encuentra en equilibrio con la muestra sólida o líquida.

Para realizar un análisis por medio de esta técnica, la muestra se introduce en un vial herméticamente cerrado y se somete a una temperatura previamente fijada durante un tiempo suficiente para que las distintas fases de los compuestos a analizar alcancen el equilibrio, es decir, hasta que la presión parcial de cada componente en la atmósfera del vial sea igual a su presión de vapor a la temperatura de trabajo.



Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-9. Sistemas de inyección de espacio de cabeza

En esencia, un analizador de espacio de cabeza consta de un horno, convenientemente termostaticado, donde se mantienen las muestras a una temperatura generalmente muy elevada, y de un sistema de muestreo capaz de inyectar en el cromatógrafo una alícuota del vapor generado por la muestra que contiene el vial.

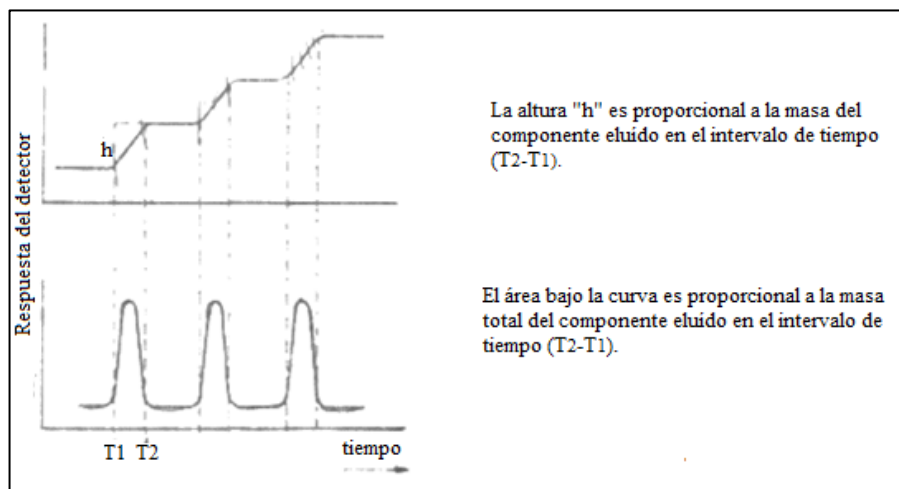
En la figura 1-9, se muestran dos tipos de sistemas de muestreo: una jeringa automática termostaticada un sistema de desplazamiento por presurización. [5]

1.3.3 SISTEMA DE DETECCIÓN

La etapa final del proceso cromatográfico es la detección de los componentes eluidos y la producción de una señal medible. Eso se logra con el detector que indica la presencia y cantidad de los componentes en una mezcla.

El detector utilizado en cromatografía de gases es un instrumento que indica y mide la cantidad de componente separado en el gas portador.

Pueden ser clasificados como "integrales" y "diferenciales" (ver figura 1-10). Un detector integral da una respuesta proporcional a la masa total del componente eluido. Un detector diferencial da una respuesta proporcional ya sea a la concentración o al flujo másico del componente eluido. Los más usados son los detectores diferenciales. ^[9]



Fuente: elaboración propia basada en apuntes de cromatografía gaseosa

Figura 1-10. Cromatografía integral y diferencial

También es posible clasificar los detectores como:

- ❖ Dependientes de la concentración (conductividad térmica, captura de electrones)
 - El detector mide la concentración de la muestra en el gas portador.
 - El uso de un mayor flujo diluye la muestra y produce una señal menor.
 - Sensibilidad- mv/mg muestra/ml gas portador.
- ❖ Dependientes del flujo másico (ionización por llama)
 - El detector mide masa (gramos) de muestra que entra al detector / tiempo.
 - Flujos mayores aumentan la sensibilidad.
 - Sensibilidad mv/mg/seg.

Las características que debe poseer un detector son:

- ❖ Alta sensibilidad.
- ❖ Bajo nivel de ruido.
- ❖ Respuesta a todo tipo de compuestos.
- ❖ Insensible a los cambios de flujo y temperatura.
- ❖ De bajo costo.

- Alta sensibilidad:

La sensibilidad de un detector hacia una sustancia eluida, puede definirse como el cambio en la señal medida (ΔS), originado por un cambio en la concentración en el gas portador de la sustancia eluida (ΔN_s). Es evidente, a partir de la ecuación de definición de señal, que la sensibilidad de un detector puede expresarse por medio de la ecuación 1.

$$\frac{\Delta S}{\Delta N_s} = k \alpha_s$$

Es decir, la sensibilidad de un detector hacia una sustancia estará dada por el producto de la constante de diseño del detector y el valor de la propiedad analizada de la sustancia eluida.

En consecuencia, la sensibilidad de cada detector será diferente, dependiendo de su diseño, y para un detector dado, la sensibilidad será diferente para sustancias diferentes.

- Bajo nivel de ruido: el ruido está compuesto por información indeseada, ajena al analito ^[23], decir que un detector debe poseer bajo nivel de ruido se refiere a que debe tener la menor cantidad de información indeseada, ya que puede interferir en la cuantificación del analito.

- Fuentes de ruido más común en análisis instrumental:

Ruido químico: fluctuaciones de temperatura, presión, humedad, materiales fotosensibles, etc. ^[23]

Los detectores más usados son:

- De conductividad térmica
- De ionización por llama
- De captura de electrones
- De nitrógeno-fosforo
- Fotométrico de llama
- Fotoionización

La calefacción del detector por lo general es independiente del horno y su temperatura debe ser de unos 25° C sobre la del horno. ^[9]

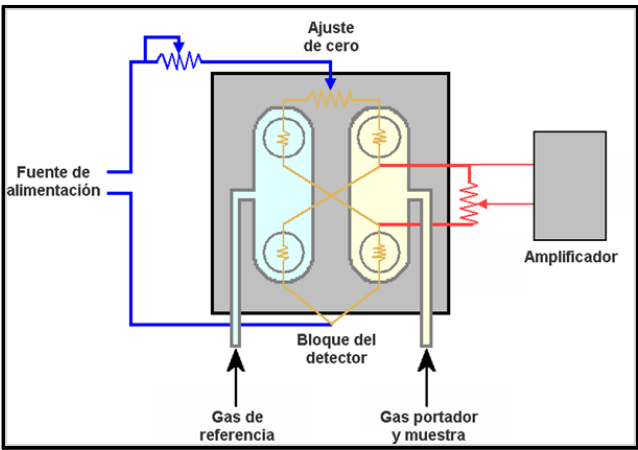
1.3.3.1 Detector de conductividad térmica:

Uno de los primeros detectores utilizados para el trabajo de rutina en cromatografía de gases, ha sido el detector de conductividad térmica o detector de hilo caliente. Este tipo de detector responde a la diferencia de conductividad térmica existente entre el gas portador puro y el gas portador mezclado con alguna otra sustancia; la magnitud de la respuesta dependerá de la diferencia de conductividad térmica entre el compuesto que eluye de la columna y el gas portador.

En un detector de conductividad, el gas procedente de la columna pasa a través de una cavidad termostatzada que contiene el elemento sensor, un hilo de metal calentado o un termistor. Cuando pasa a través del detector gas portador puro, la pérdida de calor del sensor es función de la diferencia de temperatura entre éste y la pared de la cavidad y de la conductividad térmica del gas portador; cuando eluye una sustancia mezclada con el gas portador, la conductividad térmica varía, y como consecuencia se produce un cambio de temperatura en el sensor; el cambio de temperatura, se traduce en una variación de una señal eléctrica (resistencia o voltaje según sea el elemento sensor), que es convenientemente amplificada y registrada. ^[5]

Un esquema de un detector típico de conductividad térmica se encuentra en la figura 1-11.

El detector de conductividad térmica es universal y no es destructivo; por lo general se utiliza para el análisis de gases permanentes, hidrocarburos ligeros y otros tipos de compuestos que ofrecen una respuesta pobre en otros tipos de detectores. Su sensibilidad oscila entre 10^{-6} y 10^{-8} g, con un rango dinámico lineal de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud.



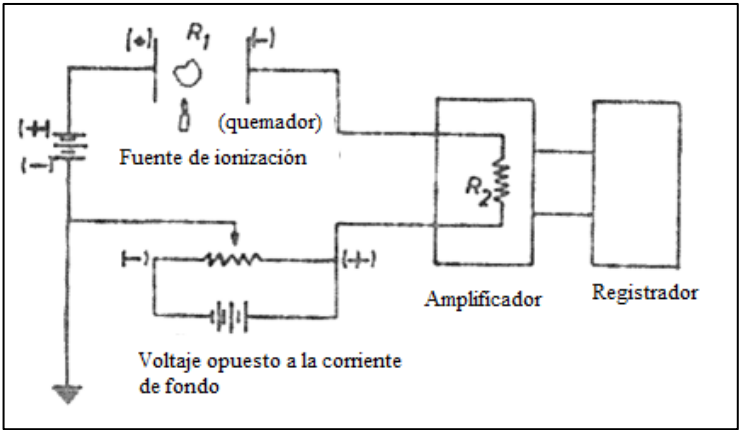
Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-11. Esquema de un detector de conductividad térmica

1.3.3.2 Detector de ionización por llama:

Principio: este detector opera según el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a las partículas cargadas que hay en él. El efluente gaseoso proveniente de la columna se mezcla con hidrogeno y es quemado usando aire como comburente. Se producen iones y electrones que son colectados por un electrodo colector (ánodo), lo cual produce una corriente I , que es amplificada y registrada en un registrador como una diferencia de voltaje (ver figuras 1-12 y 1-13).

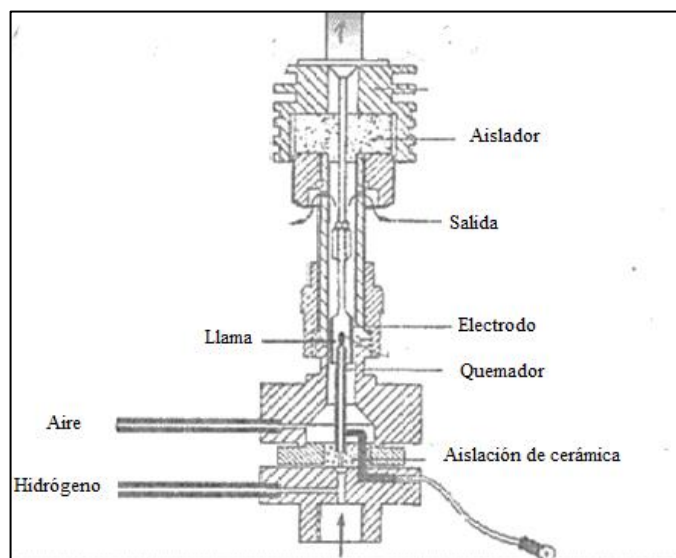
Si solo pasa gas portador por el detector, se obtiene una pequeña corriente de fondo debido a la ionización de las impurezas que trae este. Esa corriente de fondo se anula oponiendo otra en sentido contrario, por lo tanto, cuando pasa muestra por el detector, se prodúcela ionización de los componentes por la llama generándose una señal que es proporcional al número de moléculas ionizadas de la muestra.



Fuente: apuntes GC

Figura 1-12. Circuito simplificado de un detector de ionización por llama.

El electrodo negativo está constituido comúnmente por el cuerpo del quemador y el positivo por el electrodo colector.



Fuente: apuntes GC

Figura 1-13. Detector de ionización por llama

Selectividad: el detector de ionización por llama responde prácticamente a todos los compuestos orgánicos. No tiene respuesta frente a los compuestos inorgánicos, por ejemplo: agua gases inorgánicos (CO , CO_2 , H_2O_2 , SO_2 , NO , NO_2 , etc.).

Respuesta: la respuesta del detector es fuertemente dependiente de los flujos de hidrogeno y aire. En general buena sensibilidad y estabilidad se obtiene con un flujo de hidrogeno unas 10 veces menor que el del aire. En la práctica se trabaja con flujos de 30 ml/min para el hidrogeno y 300 ml/min para el aire.

Se ha comprobado también que la respuesta depende de la geometría del colector y del quemador. Su respuesta es independiente del flujo de gas portador.

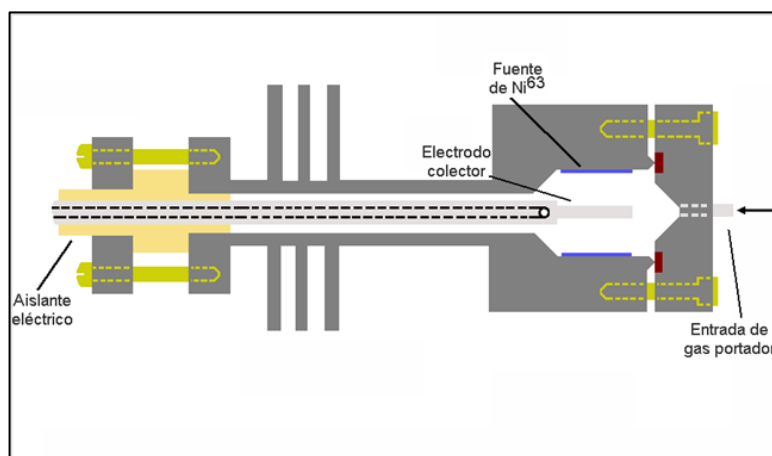
Rango lineal: el detector de ionización por llama tiene el rango lineal más amplio de todos los detectores en uso. Su rango lineal esta entre 10^6 y 10^7 , la combinación de su alta sensibilidad y su amplio rango lineal lo hacen ideal en el análisis de trazas. ^[9]

1.3.3.3 Detector de captura electrónica:

El detector de captura electrónica ocupa probablemente el segundo lugar entre los detectores de más alta utilización, debiéndose este hecho a su excepcional sensibilidad (el

detector de captura electrónica es probablemente el dispositivo analítico más sensible que se conoce). Este hecho junto a su selectividad hacia compuestos de enorme interés (fundamentalmente en los campos de medio ambiente y toxicología), hacen que sea enormemente utilizado para la detección y cuantificación de trazas.

En un detector de captura electrónica (figura 1-14), se utiliza una fuente de radiación β^- para bombardear el gas portador que pasa a través de una cámara de ionización, generándose de esta forma un plasma de iones positivos, radicales libres y electrones térmicos.



Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-14. Detector de captura electrónica tipo concéntrico

Por término medio, cada partícula β puede producir entre 100 y 1.000 electrones térmicos con un rango de energías de entre 0,02 y 0,05 eV; la aplicación de un potencial a la célula del detector de captura, permite que los electrones térmicos sean recogidos en un electrodo colector, estableciéndose de esta forma una corriente de fondo, en presencia de gas portador puro, que da lugar a la línea de base del detector. Cuando un compuesto activo frente a este detector, penetra junto con el gas portador en la célula de medida, puede capturar a los electrones térmicos para generar bien iones negativos de menor movilidad que los electrones, bien fragmentos neutros por recombinación con los iones positivos del plasma generado en el proceso primario; este proceso de captura, origina una disminución de la corriente de fondo del detector, que puede relacionarse de forma cuantitativa con la cantidad de analito que está pasando a través del detector.

Las fuentes de partículas β utilizadas en este tipo de detectores son emisores débiles, ^3H , ^{63}Ni , ^{55}Fe , o electrones emitidos por efecto termoeléctrico, aunque en la práctica solamente son asequibles detectores basados en fuentes de ^{63}Ni y en algunos casos de tritio. Como gases portadores, el detector de captura electrónica puede utilizar únicamente hidrógeno, gases nobles o nitrógeno, que deben estar libres, hasta niveles extremadamente bajos de trazas de oxígeno y vapor de agua.

El detector de captura electrónica, responde de forma muy selectiva frente a compuestos que presenten grupos con elevada afinidad electrónica, en particular halógenos y grupos nitro, ofreciendo frente a este tipo de compuestos una respuesta 10^6 - 10^7 veces superior a la que muestra frente a los hidrocarburos.

En conclusión, el detector de captura electrónica ofrece unas características muy buenas tanto por su sensibilidad como por su especificidad, no obstante, hay que resaltar que el manejo de estos detectores no es sencillo, ya que su respuesta puede ser muy variable en función de las condiciones experimentales (potencial de polarización, temperatura, caudal de gas portador, etc.), viéndose afectadas no sólo su sensibilidad sino también su selectividad y su rango dinámico lineal, que en ocasiones puede llegar a quedar muy reducido; a estas dificultades hay que añadir su sensibilidad hacia cualquier tipo de contaminación y la gran dificultad que representa su limpieza, por lo que en el trabajo con este tipo de detector deben tomarse siempre las mayores precauciones. [5]

1.3.3.3 Detector de nitrógeno-fósforo.

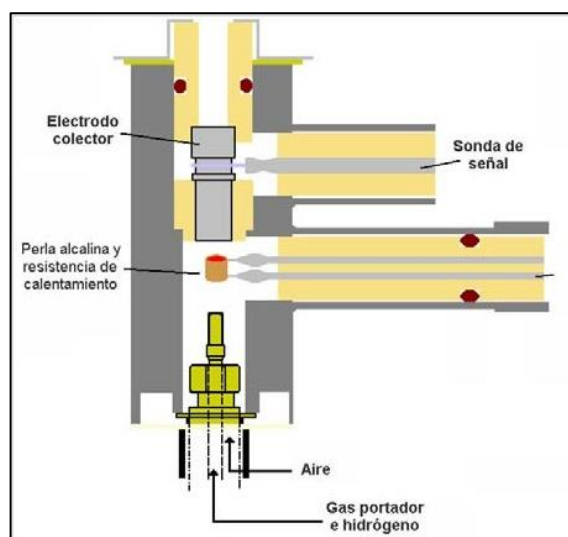
El detector NPD es en su diseño básico, es idéntico al FID, excepto que una sal de un metal alcalino se coloca entre el quemador y el colector. Un metal alcalino como Na, Rb o Cs se introduce en una matriz de sílice o cerámica de alta densidad.

La fuente alcalina se calienta por una corriente eléctrica y la temperatura de la perla de la sal del metal alcalino es controlada por la intensidad de la corriente de entrada. La temperatura de la fuente alcalina (perla) afecta la sensibilidad, corriente de fondo y duración de la misma. [9]

La selectividad de este tipo de detectores es muy dependiente de parámetros tales como la temperatura, la forma y el tamaño de la llama, la composición de la sal alcalina, geometría del detector, etc.; debido a esta dependencia de muchos parámetros experimentales, el manejo de este tipo de detector es difícil, la optimización de la respuesta es tediosa y su estabilidad, debido a pérdidas por vaporización de la sal alcalina, es muy escasa.

Parte de los problemas mencionados, han sido solucionados en muchos detectores comerciales en base a substituir la perla de sal alcalina del detector por un vidrio o una cerámica alcalina calentada eléctricamente de forma independiente. En un detector de este tipo (figura 1-15), una perla de un silicato de metal alcalino, calentada eléctricamente, se coloca entre el “jet” del detector y el electrodo colector, manteniéndose la perla a un potencial negativo para reducir las pérdidas de metal alcalino. En la región de la perla, se genera un

plasma por medio de una mezcla aire/hidrógeno, utilizándose un flujo de hidrógeno muy bajo (normalmente entre 1 y 5 ml/min), insuficiente para mantener una llama, pero suficiente para mantener un plasma en el que puedan darse los fenómenos de ionización. [5]



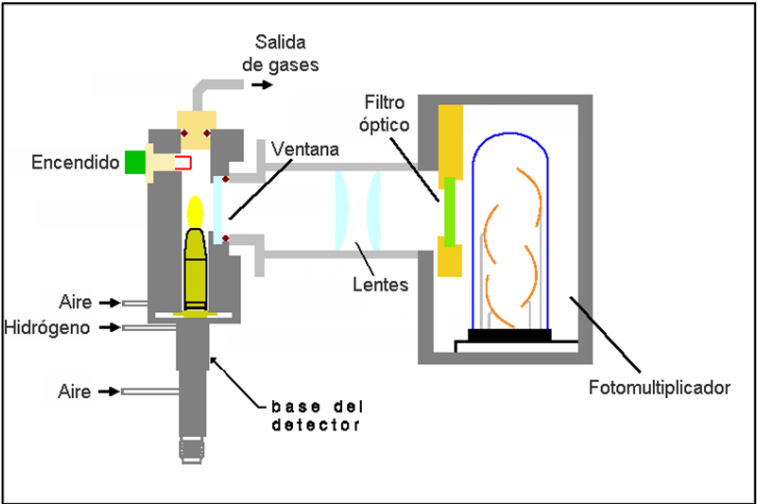
Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-15. Detector de nitrógeno-fósforo

El detector de nitrógeno fósforo ofrece una sensibilidad de aproximadamente 10^{-13} g/s de nitrógeno y 5×10^{-14} g/s de fósforo, con una especificidad de 10^4 sobre compuestos que no presenten estos átomos y su rango dinámico oscila entre 10^4 y 10^5 . El detector NPD es muy utilizado en el campo de medio ambiente, fundamentalmente para la determinación de residuos de plaguicidas, debido a su sensibilidad y a su especificidad, lo que permite minimizar la limpieza de las muestras. El principal problema que presenta este detector es la inestabilidad de su respuesta, debida fundamentalmente a contaminación o pérdida de actividad de la perla alcalina, por lo que es necesario realizar calibraciones con relativa frecuencia. [5]

1.3.3.4 Detector fotométrico de llama

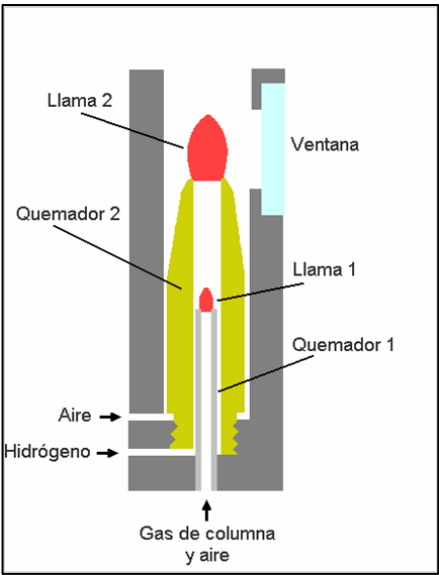
El detector fotométrico de llama (FPD), utiliza una llama de hidrógeno para excitar a un estado electrónico elevado fragmentos de moléculas que contengan átomos de azufre o fósforo. Estos dos elementos son excitados de forma óptima por la llama de hidrógeno, y cuando retornan a su estado fundamental emiten las líneas características de sus espectros; las líneas analíticas de interés son seleccionadas por medio de un filtro (392 nm para determinar azufre y 526 nm para fósforo) y la intensidad de la radiación emitida es medida por medio de un fotomultiplicador (figura 1-16).



Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-16. Esquema de un detector fotométrico de llama

En este tipo de detector, el gas portador procedente de la columna es mezclado con aire y quemado en una atmósfera de hidrógeno; la emisión de los átomos de azufre o fósforo se da fundamentalmente en la zona superior, rica en hidrógeno de la llama, por lo que en ocasiones se utiliza un diseño de doble quemador (figura 1-17) con una segunda llama para producir la excitación; este diseño, ayuda a además a evitar el fenómeno de apagado de llama, que se da en este tipo de detectores, cuando eluye de la columna un compuesto en gran cantidad (básicamente el disolvente de inyección). [5]



Fuente: cromatografía de gases [5]

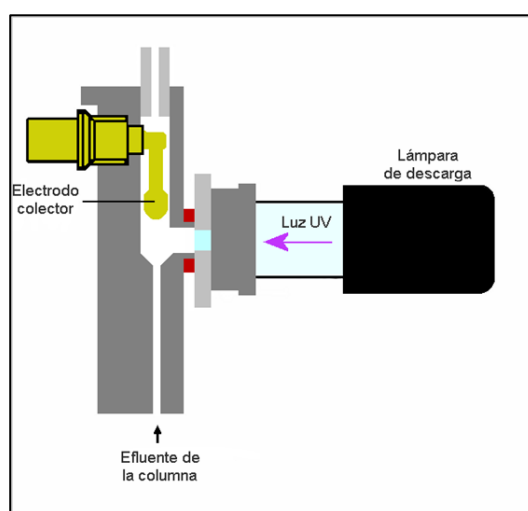
Figura 1-17. Detalle de un doble quemador

La sensibilidad y selectividad de este tipo de detectores son variables, dependiendo de su diseño y de las condiciones de trabajo, pero un valor de sensibilidad típico es 10^{-13} g/s para fósforo y 10^{-12} g/s para azufre, con un rango dinámico lineal de aproximadamente 1.000. La selectividad de estos detectores oscila entre valores de 5×10^5 para el caso del fósforo y 10^3 para el caso del azufre. [5]

1.3.3.5 Detector de fotoionización

Los detectores de fotoionización están basados en la utilización de los fotones generados en una lámpara de descarga para ionizar los compuestos orgánicos que emergen, junto con el gas portador, de una columna cromatográfica.

Este tipo de detectores, utilizan para generar la radiación un tubo de descarga que contiene una mezcla de gases a baja presión; éstos son excitados por medio de una diferencia de potencial elevada que se mantiene entre dos electrodos. La variación en las proporciones de la mezcla de gases de la lámpara, permite obtener radiación ultravioleta de diferentes energías, aunque la más utilizada es la lámpara de 10,2 Ev.



Fuente: cromatografía de gases [5]

Figura 1-18. Detector de fotoionización

En este detector (figura 1-18), el gas portador pasa a través de una cámara de ionización, separada físicamente del tubo de descarga por medio de una ventana transparente a la radiación (generalmente de MgF_2). Los compuestos que eluyen de la columna son ionizados por los fotones de alta energía procedentes de la lámpara y los iones generados son recogidos por medio de un electrodo polarizado adecuadamente.

Prácticamente la totalidad de los compuestos orgánicos dan algún tipo de respuesta con estos detectores. La sensibilidad del detector de fotoionización es dependiente del potencial de ionización del compuesto de que se trate; la respuesta del detector frente a los compuestos orgánicos sigue el orden general:

Compuestos aromáticos > alquenos > alcanos > alcoholes > ésteres > aldehídos > cetonas.

En general, el detector de fotoionización es entre 5 y 10 veces más sensible que el detector de ionización de llama frente a los alcanos, y del orden de 35 veces más sensible frente a los hidrocarburos aromáticos; su rango dinámico lineal es, por término medio, de cuatro órdenes de magnitud. ^[5]

CAPÍTULO 2: ETAPA EXPERIMENTAL

2.1 METODOLOGÍA:

2.1.1. FUNDAMENTO TEÓRICO:

Se fortifica un pool de orina con solución de tolueno en los 3 tipos de contenedores a evaluar (ver tabla 2-1), que serán expuestos a diferentes condiciones de tiempo y temperatura para comprobar eficiencia del recipiente y estabilidad del analito en la matriz orina.

Para analizar el contenido de Tolueno en las muestras de orina se utiliza el equipo GC-HS, con el cual se puede obtener el área del analito y con ello realizar un estudio estadístico.

Tabla 2-1. Contenedores a evaluar

Tipo de Contenedor	
Contenedor A	
Contenedor B	
Contenedor C	

Fuente: recolección información LHI-IST

2.1.2. EQUIPOS Y MATERIALES:

2.1.2.1. Equipos:

- ❖ Equipo de Cromatografía de Gases Autosampler Clarus 580, marca Perkin Elmer.
- ❖ Headspace Sampler Turbo-Matrix 40, marca Perkin Elmer.
- ❖ Agitador magnético

2.1.2.2 Materiales:

- ❖ Viales de 22 ml, marca Perkin Elmer.
- ❖ Septa de silicona, tapon y argolla.
- ❖ Climper de 20 mm y decapper de 20 mm.
- ❖ Material usual de laboratorio
- ❖ Matraz de aforo de 1 L y 100 ml.
- ❖ Micro-pipeta de 100 y 1000 μ L
- ❖ Micro-pipeta de 5 y 10 ml.
- ❖ Frascos para orina de 100 ml.
- ❖ Frascos para orina de 60 ml.
- ❖ Material usual de laboratorio

2.1.3 REACTIVOS:

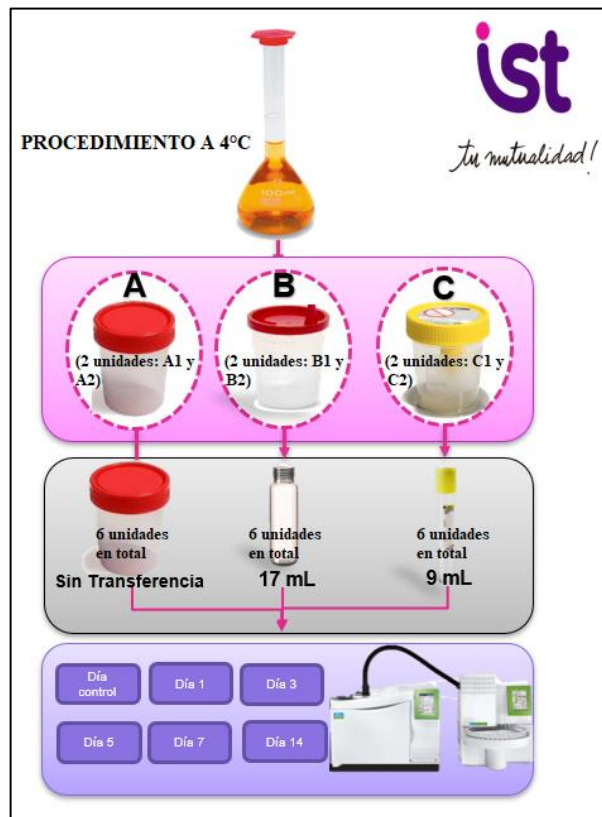
- ❖ Etanol para cromatografía líquida.
- ❖ Tolueno p.a

2.2 PROCEDIMIENTO:

1. Se recolectan muestras de orina para formar un pool de 5 litros.
2. Se mide el pH del pool (6-8)
3. Se homogeneiza el pool mediante agitador magnético durante 2 Hrs.
4. Se toman 5 matraces de aforo de un litro a los cuales se agrega 100 ml de etanol, 280 μ L de Tolueno p.a y se afora con la matriz orina.
5. Se toma el matraz del día cero y se distribuye en los frascos tipo A (A₁, A₂, A₃ y A₄), B (B₁, B₂, B₃ y B₄), y C (C₁, C₂, C₃ y C₄), llenando el 85% de su volumen total.
6. De los frascos A₁, A₂, A₃ y A₄ se toman 8 ml de cada uno en triplicado y se llevan a un vial de headspace sellando inmediatamente mediante crimper.
7. De los frascos B₁, B₂, B₃ y B₄ se toman 18 ml de cada uno en triplicado y se llevan a un vial de tapa rosca, de estos viales se toman 8 ml y se llevan a un vial de headspace sellando inmediatamente mediante crimper.
8. De los frascos C₁, C₂, C₃ y C₄ se toman 9 ml mediante vacutainer a presión en triplicado y luego de esto se toman 8 ml y se llevan a un vial de headspace sellando inmediatamente mediante crimper.
9. Se analiza mediante headspace.
10. Se toma el matraz del día uno y se distribuye en los frascos tipo A (A₁, A₂, A₃ y A₄), B (B₁, B₂, B₃ y B₄), y C (C₁, C₂, C₃ y C₄), llenando el 85% de su volumen total.

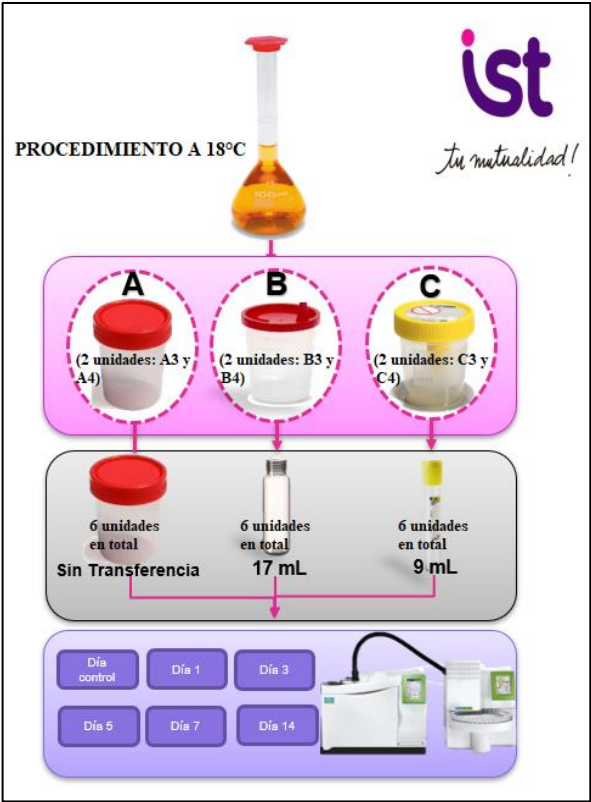
11. De los frascos A₁, A₂, A₃ y A₄ se toman 8 ml de cada uno en triplicado, 6 de ellos se guardan a 4 °C y los otros 6 a 18 °C, pasado el día 1 se toman 8 ml de cada uno y se llevan a un vial de headspace sellando inmediatamente mediante crimper.
12. De los frascos B₁, B₂, B₃ y B₄ se toman 18 ml de cada uno en triplicado, 6 de ellos se guardan a 4 °C y los otros 6 a 18 °C, pasado el día 1 se toman 8 ml de cada uno y se llevan a un vial de headspace sellando inmediatamente mediante crimper.
13. De los frascos C₁, C₂, C₃ y C₄ se toman 9 ml mediante vacutainer a presión en triplicado, 6 de ellos se guardan a 4 °C y los otros 6 a 18 °C, pasado el día 1 se toman 8 ml de cada uno y se llevan a un vial de headspace sellando inmediatamente mediante crimper.
14. Se analiza mediante headspace.
15. Se realiza lo mismo para el día 3 y 7. (ver puntos 10-14)

El diagrama del procedimiento recién descrito se muestra en las figuras 2-1 y 2-2 donde es importante notar que de cada recipiente se utilizan dos unidades por temperatura, tomando de ejemplo el recipiente A, identificando a cada unidad como A1-A2 para 4°C, y A3-A4 para 18°C. (lo mismo con el recipiente B y C).



Fuente: elaboración propia basada en presentación LHI-IST

Figura 2-1. Procedimiento para 4°C



Fuente: elaboración propia basada en presentación LHI-IST

Figura 2-2. Procedimiento para 18°C

En la tabla 2-2 se quiere identificar:

- ❖ Unidades de recipientes que se miden a la misma temperatura ejemplo A1, A2 (dos recipientes tipo A para 4°C), A3 y A4 (dos recipientes tipo A para 18°C).
- ❖ Número total de análisis realizados a la misma temperatura, para esto se utiliza el número en la columna “orden”.
- ❖ Día de análisis, para esto el ultimo dígito en cada casilla de las columnas identificadas como “DÍA” ejemplo: C2-4-1 (segundo contenedor tipo C a 4°C, cuarto análisis del día 1).

Tabla 2-2. Orden de análisis

	TEMPERATURA	ORDEN	DIA 0	DIA 1	DIA 3	DIA 5	DIA 7
RECIPIENTE A	A1 (4°C)	1	A1-1-0	A1-1-1	A1-1-3	A1-1-5	A1-1-7
		2	A1-2-0	A1-2-1	A1-2-3	A1-2-5	A1-2-7
		3	A1-3-0	A1-3-1	A1-3-3	A1-3-5	A1-3-7
	A2 (4°C)	4	A2-4-0	A2-4-1	A2-4-3	A2-4-5	A2-4-7
		5	A2-5-0	A2-5-1	A2-5-3	A2-5-5	A2-5-7
		6	A2-6-0	A2-6-1	A2-6-3	A2-6-5	A2-6-7
	A3 (18°C)	1	A3-1-0	A3-1-1	A3-1-3	A3-1-5	A3-1-7
		2	A3-2-0	A3-2-1	A3-2-3	A3-2-5	A3-2-7
		3	A3-3-0	A3-3-1	A3-3-3	A3-3-5	A3-3-7
	A4 (18 °C)	4	A4.4-0	A4.4-1	A4.4-3	A4.4-5	A4.4-7
		5	A4.5-0	A4.5-1	A4.5-3	A4.5-5	A4.5-7
		6	A4.6-0	A4.6-1	A4.6-3	A4.6-5	A4.6-7

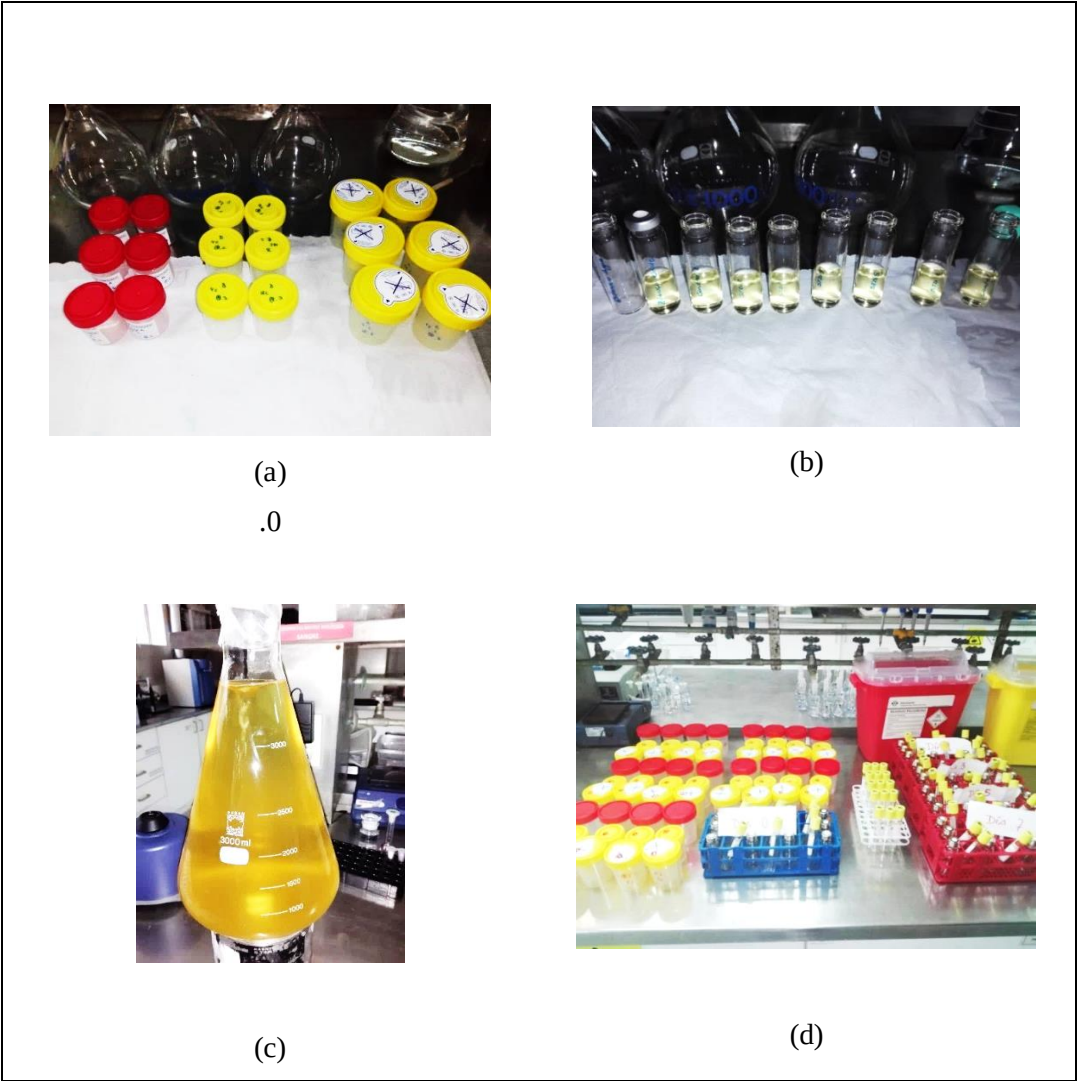
Fuente: elaboración propia basado en diseño experimental

Continuación tabla 2-3. Orden de análisis

	TEMPERATURA	ORDEN	DIA 0	DIA 1	DIA 3	DIA 5	DIA 7
RECIPIENTE B	B1 (4°C)	1	B1-1-0	B1-1-1	B1-1-3	B1-1-5	B1-1-7
		2	B1-2-0	B1-2-1	B1-2-3	B1-2-5	B1-2-7
		3	B1-3-0	B1-3-1	B1-3-3	B1-3-5	B1-3-7
	B2 (4°C)	4	B2-4-0	B2-4-1	B2-4-3	B2-4-5	B2-4-7
		5	B2-5-0	B2-5-1	B2-5-3	B2-5-5	B2-5-7
		6	B2-6-0	B2-6-1	B2-6-3	B2-6-5	B2-6-7
	B3 (18°C)	1	B3-1-0	B3-1-1	B3-1-3	B3-1-5	B3-1-7
		2	B3-2-0	B3-2-1	B3-2-3	B3-2-5	B3-2-7
		3	B3-3-0	B3-3-1	B3-3-3	B3-3-5	B3-3-7
	B4 (18 °C)	4	B4-4-0	B4-4-1	B4-4-3	B4-4-5	B4-4-7
		5	B4-5-0	B4-5-1	B4-5-3	B4-5-5	B4-5-7
		6	B4-6-0	B4-6-1	B4-6-3	B4-6-5	B4-6-7
RECIPIENTE C	C1 (4°C)	1	C1-1-0	C1-1-1	C1-1-3	C1-1-5	C1-1-7
		2	C1-2-0	C1-2-1	C1-2-3	C1-2-5	C1-2-7
		3	C1-3-0	C1-3-1	C1-3-3	C1-3-5	C1-3-7
	C2 (4°C)	4	C2-4-0	C2-4-1	C2-4-3	C2-4-5	C2-4-7
		5	C2-5-0	C2-5-1	C2-5-3	C2-5-5	C2-5-7
		6	C2-6-0	C2-6-1	C2-6-3	C2-6-5	C2-6-7
	C3 (18°C)	1	C3-1-0	C3-1-1	C3-1-3	C3-1-5	C3-1-7
		2	C3-2-0	C3-2-1	C3-2-3	C3-2-5	C3-2-7
		3	C3-3-0	C3-3-1	C3-3-3	C3-3-5	C3-3-7
	C4 (18 °C)	4	C4-4-0	C4-4-1	C4-4-3	C4-4-5	C4-4-7
		5	C4-5-0	C4-5-1	C4-5-3	C4-5-5	C4-5-7
		6	C4-6-0	C4-6-1	C4-6-3	C4-6-5	C4-6-7

Fuente: elaboración propia basada en procedimiento

Figura 2-3.



Imágenes de procedimiento. (a) Recipientes a evaluar. (b) Viales headspace. (c) Matraz con orina para homogeneizar. (d) Preparación de muestras para luego llevar a la temperatura indicada

2.2.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Tabla 2-4. Condiciones cromatográficas del horno

Tiempo de equilibrio	2 min
Max temperatura	200 °C
Split	100

Fuente: Elaboración propia basada en tesis “Determinación de compuestos cannabinoides en una tintura de cannabis sativa” [20]

Tabla 2-5. Condiciones cromatográficas del horno (continuación)

Programa de Horno	5°C/min a 90°C por 3 min 10 °C/min a 200°C por 2 min
Tiempo de ejecución	19,00 min

Fuente: Elaboración propia basada en tesis “Determinación de compuestos cannabinoides en una tintura de cannabis sativa” [20]

Tabla 2-6. Condiciones cromatográficas de la columna

Columna 240°C: 75m*0,53mmID*3 µm df	
T° inicial	180°C
Presión	6,2 psi
Fluido	3,0 ml/min
Velocidad media	22,3 cm/seg
Tiempo de espera	1,1865 min
Programa de flujo (apagado)	1,2 ml/min por 0 min
Tiempo de ejecución	23,718 min

Fuente: Elaboración propia basada en tesis “Determinación de compuestos cannabinoides en una tintura de cannabis sativa” [20]

Tabla 2-7. Condiciones cromatográficas del headspace

Temperatura de muestra	1,80 min
Temperatura de la línea de transferencia	130 °C
Tiempo del termostato	30,0 min
Vial temblando	30,0 min
Presión del vial	25,0 psi
Tiempo de presurización	1,0 min
Tiempo de inyección	0,08 min
Tiempo de retiro	0,2 min
Tiempo del ciclo	24,5 min

Fuente: Elaboración propia basada en tesis “Determinación de compuestos cannabinoides en una tintura de cannabis sativa” [20]

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la siguiente sección se muestran los resultados recuperados durante los días de análisis para ambas temperaturas y pruebas T-student para afirmar que estos resultados se pueden tomar como hexaplicado. Se evalúa el recipiente A, B y C por separado a ambas temperaturas con su respetiva estadística básica, considerando que el contenedor B no es apto para este análisis. Se continúa discutiendo la factibilidad de utilizar el contenedor A o C según el % de baja respecto a áreas obtenidas al pasar los días de análisis tomando el promedio del día 0 como 100%.

Para lograr determinar la estabilidad del tolueno en orina, la cual se define en este caso como perdida del analito en base a la concentración inicial afectada por las variables temperatura, tiempo y tipo de contenedor se utilizaron dos conservadores de temperatura diferentes, los cuales tenían una fluctuación de +- 0,5°C para mantener la temperatura estable a 4°C y +-2°C para conservar las muestras a 18°C.

Tabla 3-1. Resumen de resultados obtenidos a 4°C

	4 ° C				
RECIPIENTE	DIA 0	DIA 1	DIA 3	DIA 5	DIA 7
A1	1153332.37	1069763.98	947617.01	747837.32	777355.50
	1136466.22	973348.96	867483.7	816560.68	795725.89
	1168835.27	938858.76	817187.12	737688.46	744691.47
A2	1159818.84	989269.61	816320.83	774782.16	717781.12
	1146419.8	723586.61	887148.22	703402.41	789247.49
	1165964.18	811048.99	899795.1	811843.69	732779.33
B1	861317.3	648932.47	1028335.03	781681.9	1025317.11
	842251.2	859433.38	1024332.78	921354.08	969871.45
	905484.6	648829.27	845468.30	876433.36	1003433.16
B2	787385.9	997466.99	935807.57	983818.93	989163.82
	701664.1	949696.49	979245.83	886054.91	838054.16
	645038.7	801016.32	965138.49	713396.22	976434.69
C1	989661.8	930903.54	833385.88	813192.69	711492.78
	942403.7	945153.43	806043.94	813544.00	741743.50
	960973.3	974845.15	884487.03	811517.59	728145.64
C2	1016691.5	977275.14	810965.61	826690.52	741319.37
	1022521.2	999142.40	806557.93	838361.04	739048.38
	903673.9	907716.12	809531.34	817733.48	794292.20

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Tomando en cuenta el procedimiento del análisis de estabilidad del analito en cuestión, la orina que se utilizó debía cumplir con ciertos requisitos, tales como, un pH normal para una persona sana, que según bibliografía va desde 4,5 a 8,0; siendo idealmente 6,0; ya que superior a este rango puede indicar una infección bacteriana de las vías urinarias, [21] afectando la identificación y cuantificación del analito. Luego de medir el pH en la orina,

dando como resultado 6,0; el llenado de cada recipiente fue de un 85 % del total para evitar pérdidas.

Los resultados obtenidos por cada inyección se observan en la tabla 3-1 y 3-2.

Tabla 3-2. Resumen de resultados obtenidos a 18°C

	18 ° C				
RECIPIENTE	DIA 0	DIA 1	DIA 3	DIA 5	DIA 7
A3	1086165.76	690212.59	615468.74	464130.51	456416.02
	1121767.9	759444.46	626972.43	462615.97	445037.04
	1094488.35	709005.77	616504.98	412265.44	458427.48
A4	1052611.14	713020.46	629189.06	506671.51	499219.50
	1049316.03	716358.8	647749.35	485468.79	453565.39
	1022372.02	763362.74	647749.35	484402.27	486264.10
B3	865780.3	918308.59	667811.06	836125.92	872141.17
	830542.5	773044.32	924025.92	813041.26	906138.01
	515447.6	848244.51	962935.92	851332.51	911661.61
B4	902965.0	845348.16	972314.89	894174.3	841638.51
	593562.2	633167.88	976103.16	652270.19	928164.99
	784639.8	817094.11	831115.67	820974.26	904362.91
C3	941056.9	838538.61	571869.23	593044.43	511898.42
	988841.3	831254.12	599310.36	602988.66	575160.80
	929241.3	821816.5	652148.1	542968.85	554745.10
C4	995767.0	802230.5	637980.26	601364.89	510936.38
	947318.5	839221.03	632934.51	500690.81	514004.75
	991591.2	823014.09	642046.81	534987.34	505169.61

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Para realizar los estudios estadísticos se logra definir como base de comparación el área obtenida por cada muestra inyectada, ya que esta, es directamente proporcional con la concentración y es mucho más representativa, dejando en claro que utilizando cualquiera de las dos unidades dan resultados estadísticos idénticos.

Según el diseño experimental que se muestra en la figura 2-1. y 2-2. se realizan los análisis en hexaplicado, tomando dos recipientes distintos, de los cuales se obtienen 3 viales por recipiente, lo que nos da una suma de 6 viales por temperatura y día de análisis.

Para asegurar que las muestras por vial son comparables entre sí, se realiza una prueba T-student para cada caso (ver tablas 3-3. y 3-4.) donde $t_{cal} < t_{crit}$ para el recipiente A a ambas temperaturas y para el recipiente C a 18°C, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre ambos recipientes, por lo que se aprueba tomar como hexaplicado el ensayo, a pesar de que para el recipiente C a 4°C hubo diferencia, debido a un error metodológico.

Tabla 3-3. T-student comparativo entre recipientes del mismo tipo para A

Recipiente A a 4°C	Variable 1 (A1)	Variable 2 (A2)
Media	40.81987707	44.37533715
Varianza	1158.932687	986.3187604
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.988313997	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-1.406651557	
P(T<=t) dos colas	0.232266951	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Recipiente A a 18 °C	Variable 1 (A3)	Variable 2 (A4)
Media	59.32378473	54.97856708
Varianza	627.0534331	735.2808236
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.998395585	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3.815536899	
P(T<=t) dos colas	0.018850322	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Tabla 3-4. T-student comparativo entre recipientes del mismo tipo para C

Recipiente C a 4°C	Variable 1 (C1)	Variable 2 (C2)
Media	30.90687015	31.57307865
Varianza	1560.241107	1521.735437
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.998098206	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.603088754	
P(T<=t) dos colas	0.578975568	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Recipiente C a 4°C	Variable 1 (C1)	Variable 2 (C2)
Media	46.16741748	48.58322227
Varianza	1042.058374	978.2550718
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.996020692	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-1.796331294	
P(T<=t) dos colas	0.146864084	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

3.2 RECIPIENTE “A” A 4°C Y 18°C

El recipiente A es un Contenedor de polipropileno, estéril, utilizado comúnmente en recolección de orina (120 ml).

Para llevar a cabo el procedimiento del recipiente A, luego del llenado y distribución de cada recipiente según día de análisis, se procede a guardar en los distintos conservadores de temperatura, para luego, al momento de realizar el análisis, pasar la muestra al vial headspace.

Lo primero que se logra detectar durante el análisis es la pérdida de concentración inicial de tolueno al llenar los recipientes (día 0), esto para ambas temperaturas. Solo tomando en cuenta la temperatura de 4°C se observa que el recipiente A dio un área de 1.155.139,45; el recipiente B dio un área de 790.523,607 y el recipiente C 972.654,23 de área (ver figuras 3-5; 3-7, 3-9, respectivamente), esto puede ser debido a la manipulación, la cual es diferente para cada uno de los recipientes.

A pesar de que la hermeticidad del recipiente B es un poco mejor que la del recipiente A, este último tiene menor manipulación, ya que según lo mencionado anteriormente la muestra se agrega directamente al recipiente, luego se refrigera y se pasa al vial headspace, en cambio, en el recipiente B, luego de agregar la muestra, esta se pasa a un vial tapa rosca, para nuevamente ser manipulada y agregada al vial headspace el día de análisis, por lo tanto, puede haber un porcentaje de pérdida durante esa manipulación, esto quiere decir que el recipiente A es el que tiene menor pérdida de concentración inicial.

Vale mencionar que las tablas 3-5 a la 3-10 muestran los resultados de estadística básica para los días de análisis respecto a las áreas obtenidas, de los cuales se utiliza el promedio para realizar tablas de porcentaje de baja de área y cálculo de T-student.

Tabla 3-5. Resultados estadísticos para recipiente A a 4°C

Recipiente A 4°C	Días				
	0	1	3	5	7
Promedio	1155139.45	917646.152	872591.997	765352.453	759596.8
Moda	-	-	-	-	-
Mediana	1156575.61	956103.86	877315.96	761309.74	761023.485
CV	0.01063528	0.13856873	0.05808113	0.05779349	0.04241357
Desviación Estándar	12285.2294	127157.062	50681.1293	44232.3891	32217.2086
Varianza	150926862	1.6169E+10	2568576869	1956504245	1037948528

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Tabla 3-6. Resultados estadísticos para recipiente A a 18°C

Recipiente A 18°C	Días				
	0	1	3	5	7
Promedio	1071120.2	725234.137	630605.652	469259.082	466488.255
Moda	-	-	-	-	-
Mediana	1069388.45	714689.63	628080.745	474266.39	457421.75
CV	0.03374431	0.04063303	0.02277095	0.06879244	0.04553484
Desviación Estándar	36144.2139	29468.4602	14359.4906	32281.4775	21241.4666
Varianza	1306404202	868390146	206194971	1042093792	451199904

Fuente: elaboración propia

3.3 RECIPIENTE “B” A 4°C Y 18°C

El contenedor B es un recipiente de polipropileno estéril de 60 ml con boquilla para llenar un frasco de vidrio con tapa de aluminio hermética de 20 ml, recomendado en la norma NIOSH 8319 para toma de muestras de acetona y metil etil cetona en orina.^[23]

La hermeticidad del recipiente B, (como se menciona en el punto 3.2) se compara con la del recipiente A, observando que el recipiente B es el que tiene mayor pérdida inicial. No solo esto lo convierte hasta ahora en el peor recipiente para mantener estable el tolueno según los resultados obtenidos, sino que, además, tanto a la temperatura de 4 °C como a la de 18°C, comienza a fluctuar la concentración al pasar los días, esto se observa en la tabla 3-7. Donde al día 0 da un área de 790.523,607 y al séptimo día da un área de 967.045,732; así mismo, en la tabla 3-8. Donde a la T° de 18°C al día 0 da un área de 748.822,88 y al séptimo día da un área de 894.017,867; comportándose de una manera no esperada, ya que en este caso aumenta la concentración en vez de tener una baja constante en el área con el paso de los días. Esto se puede deber a la contaminación en el lugar de trabajo al manipular la muestra, es decir, al pasar la muestra del vial tapa rosca al vial headspace, ya que se ha reportado que las muestras de orina pueden sufrir contaminación si el lugar donde se toma la muestra hay presencia del compuesto volátil en el ambiente, por lo tanto, se convierte en el recipiente más inestable y quedando fuera de la discusión por su baja hermeticidad y extensa manipulación previa al análisis por cromatografía.

Tabla 3-7. Resultados estadísticos para recipiente B a 4°C

Recipiente B 4°C	Días				
	0	1	3	5	7
Promedio	790523.607	817562.487	963054.667	860456.567	967045.732
Moda	-	-	-	-	-
Mediana	814818.56	830224.85	972192.16	881244.135	982799.255
CV	0.12646712	0.18039585	0.07019821	0.11347662	0.06850521
Desviación Estándar	99975.2428	147484.883	67604.7143	97641.6987	66247.6733
Varianza	9995049174	2.1752E+10	4570397401	9533901319	4388754218

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Tabla 3-8. Resultados estadísticos para recipiente B a 18°C

Recipiente B 18°C	Días				
	0	1	3	5	7
Promedio	748822.88	805867.928	889051.103	811319.74	894017.867
Moda	-	-	-	-	-
Mediana	807591.135	831221.135	943480.92	828550.09	905250.46
CV	0.21027791	0.12034292	0.13637114	0.10234578	0.03520642
Desviación Estándar	157460.908	96980.502	121240.912	83035.1482	31475.1723
Varianza	2.4794E+10	9405217775	1.4699E+10	6894835837	990686474

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

3.4 RECIPIENTE “C” A 4°C Y 18°C

El contendor C es un contenedor estéril de polipropileno de 120 ml, con cánula y aguja interior para utilizar con tubos de vacío de 9 ml (tapón hermético).
Material compatible con toma de muestra a tolueno por su resistencia química.

El contenedor C presenta ventajas en la manipulación y toma de muestra sobre los contenedores A y B, su sistema al vacío permite una transferencia limpia de la muestra de orina contenida en el recipiente directamente al tubo al vacío de 9 ml, permitiendo recolectar una muestra representativa para análisis evitando perdidas por manipulación, menor espacio cabeza en el tubo (perdida por volatilidad), de fácil almacenamiento para envío al laboratorio además de evitar pérdidas por derrame debido al tapón hermético del tubo.

Tabla 3-9. Resultados estadísticos para recipiente C a 4°C

Recipiente C 4°C	Días				
	0	1	3	5	7
Promedio	972654.23	955839.297	825161.955	820173.22	742673.645
Moda	-	-	-	-	-
Mediana	975317.535	959999.29	810248.475	815638.74	740183.875
CV	0.04717037	0.03547129	0.03733135	0.01275061	0.03742954
Desviación Estándar	45880.4591	33904.8564	30804.4089	10457.7112	27797.9361
Varianza	2105016526	1149539288	948911609	109363723	772725254

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Tabla 3-10. Resultados estadísticos para recipiente C a 18°C.

Recipiente C 18°C	Días				
	0	1	3	5	7
Promedio	965636.035	826012.475	622714.878	562674.163	528652.51
Moda	-	-	-	-	-
Mediana	968079.925	827134.105	635457.385	568006.64	512951.585
CV	0.03066552	0.01669645	0.04929038	0.07557452	0.05485259
Desviación Estándar	29611.7354	13791.4733	30693.8505	42523.828	28997.9604
Varianza	876854874	190204736	942112460	1808275944	840881710

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

3.5 INFLUENCIA DEL TIEMPO Y TEMPERATURA PARA LOS CONTENEDORES A Y C

Para poder comparar los recipientes evaluados según las variables tiempo y temperatura se realizó un análisis estadístico simple, un cuadro resumen para determinar la baja de áreas al pasar los días en relación al día 0 el cual se tomará como 100%. (ver tabla 3-11. Y 3-12.) ya que se debe tener la misma base para ambos recipientes, porque al comparar solo por áreas no se podría debido a su diferencia inicial; y una prueba T-student para corroborar con estadística la analítica utilizada.

3.5.1 BAJA DE ÁREAS RESPECTO AL DIA 0 A 4 ° C

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la tabla 3-11. se deja en claro que a la temperatura de 4°C el recipiente que logra mantener más estable el tolueno hasta el día 7 es el C, ya que al día 1 solo baja un 1,73% luego al día 3 y 5 se mantiene con una baja de 15% aproximadamente, y al día 7 disminuye a un 23,64% del total de área.; en cambio el recipiente A al día 1 ya tiene un descenso considerable de área de analito, llegando a 20,56%, y al final de la semana a 34,24%.

Tabla 3-11. Baja de área respecto al día 0 a 4°C. Si el valor porcentual es positivo se refiere a una baja de área, en cambio, si es negativo, se refiera a un aumento de área.

RECIPIENTE	BAJA DE ÁREA RESPECTO AL DÍA 0 EN PORCENTAJE (4°C)									
	0		1		3		5		7	
	ÁREA	%	ÁREA	%	ÁREA	%	ÁREA	%	ÁREA	%
A	1155139,45	100	917646,152	20,56	872591,997	24.46	765352,453	33,74	759596,8	34,24
B	790523,607	100	817562,487	-3,42	963054,667	-21.82	860456,567	-8,85	967045,732	-22,33
C	972654,23	100	955839,297	1,73	825161,955	15.16	820173,22	15,68	742673,645	23,64

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

3.5.2 BAJA DE ÁREAS RESPECTO AL DIA 0 A 18 ° C

Considerando los resultados de la tabla 3-12. se observa que la baja de área del recipiente A a temperatura de 18°C al día 1 es casi tanto como la baja de área del mismo recipiente al día 7 a temperatura de 4°C, llegando al día 7 a 22,21% más de perdida a 18°C.

Por otra parte, los resultados del recipiente C a 18°C al día 1, con una pérdida de área de 14,46% es comparable con la perdida que tiene el mismo recipiente a 4°C al día 3 y 5 (ver tabla 3-11.) con un área de 15.16% y 15,68% encontrándose entre valores similares.

Al día 7 el recipiente C a ambas temperaturas tiene una diferencia de 21,61% de perdida entre sí, siendo más favorable el recipiente C a 4°C

Tabla 3-12. Baja de áreas respecto al día 0 a 18°C. Si el valor porcentual es positivo se refiere a una baja de área, en cambio, si es negativo, se refiera a un aumento de área.

RECIPIENTE	BAJA DE ÁREA RESPECTO AL DÍA 0 EN PORCENTAJE (18°C)									
	0		1		3		5		7	
	ÁREA	%	ÁREA	%	ÁREA	%	ÁREA	%	ÁREA	%
A	1071120,2	100	725234,137	32,29	630605,652	41,13	469259,082	56,19	466488,255	56,45
B	748822,88	100	805867,928	-7,62	889051,103	-18,73	811319,74	-8,35	894017,867	-19,39
C	965636,035	100	826012,475	14,46	622714,878	35,51	562674,163	41,73	528652,51	45,25

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Como se menciona en el punto 3.5, se toma como base el porcentaje de áreas siendo el día 0 el 100%. Para poder llevar más a fondo este estudio se realizó una prueba T-student para determinar si había real variación entre ambos recipientes.

Para la temperatura de 4°C, da por resultado un estadístico t calculado de 3,32; siendo el valor critico de t 2,77; dado que el valor estadístico calculado es mayor al valor del T crítico, esto nos deja en claro la diferencia significativa entre ambos recipientes siendo favorable para el recipiente C. (ver tabla 3-13.)

Tabla 3-13. Prueba T-student para dos muestras emparejadas a 4 °C (recipientes A y C)

	Variable 1 (recipiente A)	Variable 2 (recipiente C)
Media	42.6	31.242
Varianza	1064.4926	1539.30442
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.99414775	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3.3165636	
P(T<=t) dos colas	0.029473	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Para la temperatura de 18°C, da por resultado un estadístico t calculado de 3,09; siendo el valor critico de t 2,77; dado que el valor estadístico calculado es mayor al valor del T crítico, al igual que en 4°C se deja en claro la diferencia significativa entre ambos recipientes siendo favorable para el recipiente C. (ver tabla 3-14.)

Tabla 3-14. Prueba T-student para dos muestras emparejadas a 18°C (recipiente A y C)

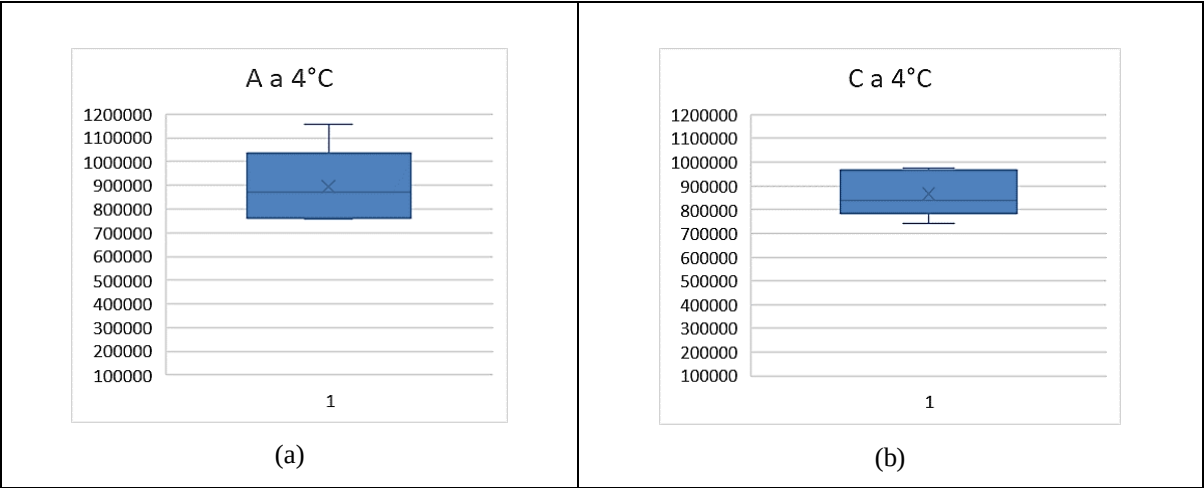
	Variable 1 (recipiente A)	Variable 2 (recipiente C)
Media	57.212	47.39
Varianza	678.04372	1007.48665
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0.98916667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3.09312926	
P(T<=t) dos colas	0.03646336	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Desde el punto de vista estadístico y analítico el recipiente C presenta menor pérdida con respecto al recipiente A en función del tiempo y en función de la concentración del analito la cual es directamente proporcional con el área obtenida.

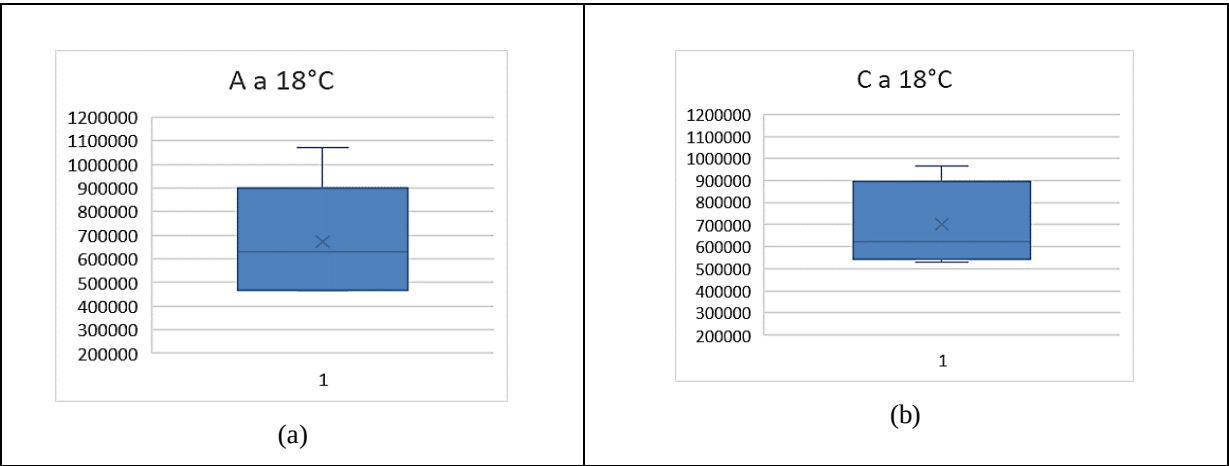
3.5.3. INTERPRETACION DIAGRAMA DE CAJAS Y BIGOTES

Solo con observar la apariencia grafica de los diagramas de cajas y bigotes de los recipientes A y C a ambas temperaturas (ver figuras 3-1. Y 3-2.) se puede notar mejor dispersión de datos en C.



Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Figura 3-1. Diagrama de cajas y bigotes. (a) Áreas obtenidas del recipiente A a 4°C desde el día 0 al día 7. (b) Áreas obtenidas del recipiente C a 4°C desde el día 0 al día 7



Fuente: elaboración propia basada en resultados obtenidos

Figura 3-2. Diagrama de cajas y bigotes. (a) Áreas obtenidas del recipiente A a 18°C desde el día 0 al día 7. (b) Áreas obtenidas del recipiente C a 18°C desde el día 0 al día 7.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Según los análisis realizados queda demostrado que:

- ❖ El contenedor A puede mantener más estable el analito tolueno a 4°C que a 18°C, pero no es el contenedor más hermético.
- ❖ El contenedor B no es apto para mantener estable el tolueno a ninguna de las variables evaluadas.
- ❖ El contenedor C resulta ser el más apto para mantener estable el tolueno hasta el día 5 a 4°C, reafirmando lo propuesto en bibliografía.

Por lo tanto, se recomienda que, al replicar el estudio, se tomen precauciones, como medir tolueno en el espacio de laboratorio donde se preparan las muestras, para saber si influye en los contenedores con baja hermeticidad como el contenedor B en este caso, así también, validar los estudios para el recipiente C afinando las condiciones entre el día 0 y 5.

se deja en claro que es necesario mantener en todo momento la muestra de orina bajo cadena de frío (+/-4°C) previo análisis de tolueno en orina, y que no pasen más de 24 hrs desde la toma de muestra hasta el análisis en laboratorio idealmente.

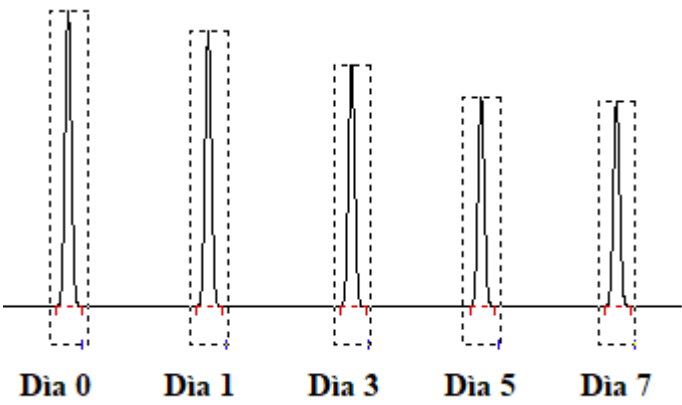
BIBLIOGRAFÍA

- [1] ABOUT G. COSTAS. Ciencia y Biología: Compuestos orgánicos volátiles (Covs o Vocs). [en línea] < <https://cienciaybiologia.com/compuestos-organicos-volatiles-covs-o-vocs/> > [consulta: 10 noviembre 2017]
- [2] PRTR. Registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes: tolueno. [en línea] <<http://www.prtr-es.es/Tolueno,15660,11,2007.html>> [consulta: 10 noviembre 2017]
- [3] ATSDR. Resumen de salud publicada: tolueno [en línea] < https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs56.pdf > [consulta: 18 noviembre 2017]
- [4] MARIANGEL ANTEQUERA, informe de práctica 2017, IST.
- [5] MNCN.CSIC. Cromatografía de Gases. [en línea]. < http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf > [consulta: 30 de junio de 2016]
- [6] HBM. Biological Application Data Sheet: tolueno [en línea]. < <http://humanbiologicalmonitoring.eu/wp-content/uploads/2015/05/Toluene-1.1-2010.pdf> > [consulta: 20 noviembre 2017]
- [7] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY WASHINGTON D.C. toxicological review of toluene [en línea] < https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0118tr.pdf > [consulta: 18 noviembre 2017]
- [8] SLIDESHARE. Toxicocinética. [en línea] <<https://es.slideshare.net/Quimicuenta/toxicocinetica>> [consulta: 20 noviembre 2017]
- [9] MIGUEL ZAZOPULOS GARAY; Apuntes GC introducción a la cromatografía; 2016.
- [10] EUPATI. Academia Europea de Pacientes: toxicocinética. [en línea] < <https://www.eupati.eu/es/glossary/toxicocinetica/> > [consulta: 20 noviembre 2017]
- [11] EPIDEMIOLOGÍA AMBIENTAL. Módulo 3: Evaluación de la exposición y efectos en la salud: toxicocinética. [en línea] < http://tie.inspvirtual.mx/temporales/OPS_Recursos/infograficos/toxicologia/pdf/Procesos%20de%20la%20toxicocin%C3%A9tica.pdf > [consulta: 10 diciembre 2017]
- [12] MEDILAB. monitoreo biológico (vigilancia sanitaria de exposición a riesgos químicos). [en línea] <http://medilab.com.uy/monitoreo-biologico-vigilancia-sanitaria-de-exposicion-a-riesgos-quimicos/> [consulta: 10 diciembre 2017]

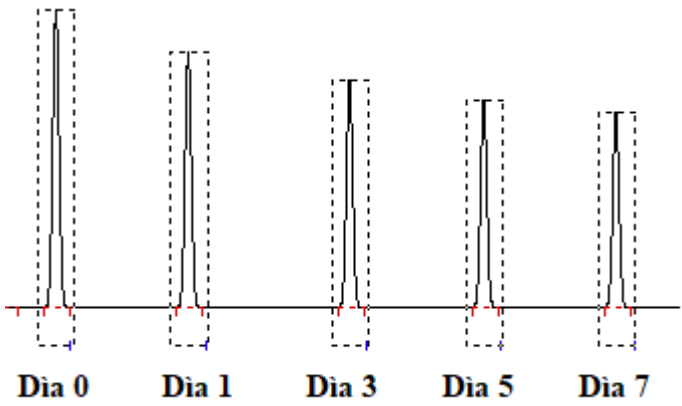
- [13] ISTAS: BBDD RISCTOX. Compuestos orgánicos volátiles (COV) [en línea] <<https://risctox.istas.net/index.asp?idpagina=621>> [consulta: 20 noviembre 2017]
- [14] ASTURIAS. Red ambiental de Asturias: Compuestos Orgánicos Volátiles (COV). [en línea] <<https://www.asturias.es/portal/site/medioambiente/menuitem.1340904a2df84e62fe47421ca6108a0c/?vgnextoid=00e8e54f41639210VgnVCM10000097030a0aRCRD>> [consulta: 18 noviembre 2017]
- [15] PAULA SERRANO YUSTE. Certificados energéticos: Compuestos Orgánicos Volátiles, no se ven, pero existen. [en línea] <<https://www.certificadosenergeticos.com/compuestos-organicos-volatiles-ven-existen>> [consulta: 20 noviembre 2017]
- [16] RETC. ¿Qué son los Compuestos Orgánicos Volátiles (Covs) y que daños producen? [en línea] <<http://www.retc.cl/que-son-los-compuestos-organicos-volatiles-covs-y-que-danos-producen/>> [consulta: 18 noviembre 2017]
- [17] GEOSALUD. calidad del aire interior: compuestos orgánicos volátiles. [en línea] <https://www.geosalud.com/ambiente/compuestos_organicos.html> [consulta: 10 diciembre 2017]
- [18] GOOGLE. Fórmulas estructurales y química modelo de la molécula de tolueno. [en línea] <<https://sp.depositphotos.com/47319571/stock-illustration-structural-formulas-and-chemical-model.html>> [consulta: 18 noviembre 2017]
- [19] KAWAI T; MIZUNUMA K; OKADA Y; HORIGUCHI S; IKEDA M. Toluene itself as the best urinary marker of toluene exposure. [en línea] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832293>> [consulta: 20 noviembre 2017]
- [20] FRANCISCA QUEZADA; MARÍA SOLEDAD LAZO. Tesis “Determinación de compuestos cannabinoides en una tintura de cannabis sativa”. Año 2017.
- [21] OMEDA. Valores de la orina: Composición. [en línea] <https://www.onmeda.es/exploracion_tratamiento/valores_orina-valor-del-ph-4457-3.html> [consulta: 18 noviembre 2017]
- [22] NIOSH 8319. acetone and methyl ethyl ketone in urine. [en línea] <<https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/8319.pdf>> [consulta: 20 noviembre 2017]
- [23] SEÑALES Y RUIDOS. [en línea] <<https://www.fing.edu.uy/iq/analisis/cursos/ainst/ruido.pdf>> [consulta: 18 noviembre 2017]

ANEXOS

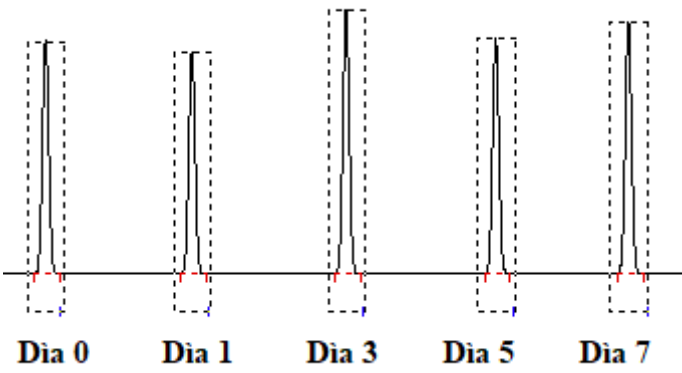
ANEXO A: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A1 a 4°C



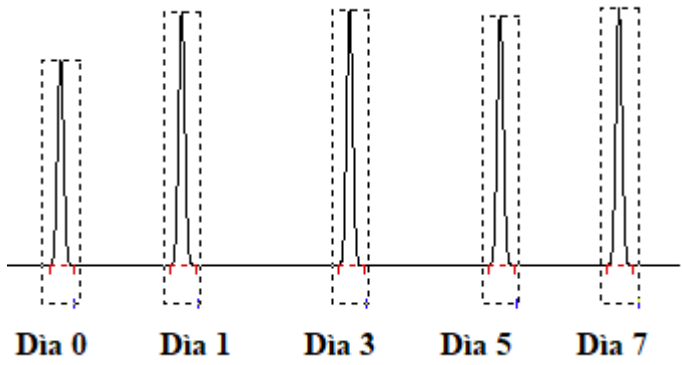
ANEXO B: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A2 a 4°C



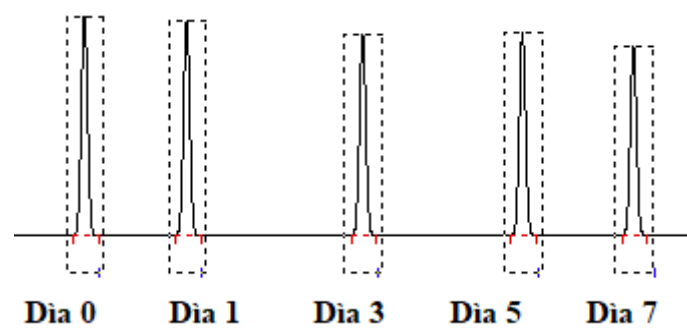
ANEXO C: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B1 a 4°C



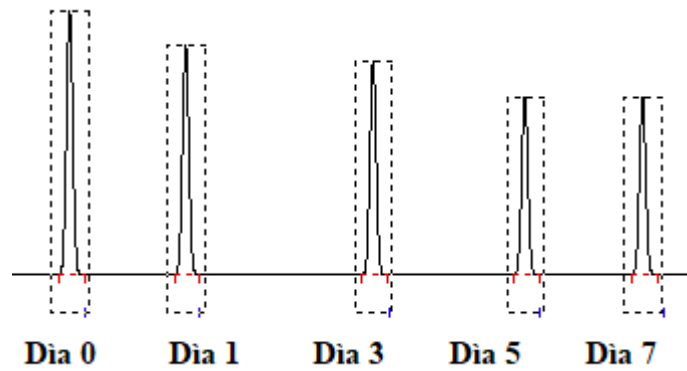
ANEXO D: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B2 a 4°C



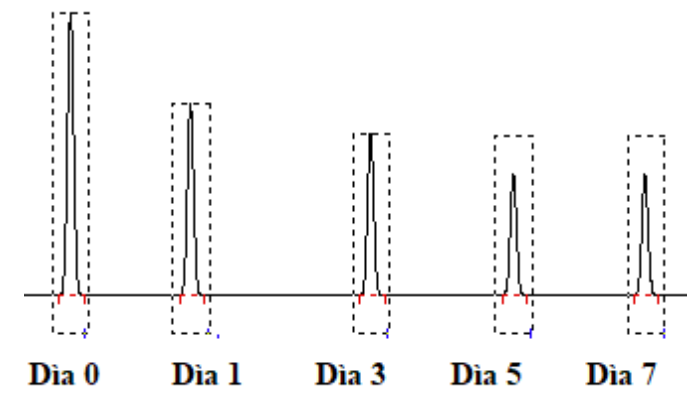
ANEXO E: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C1 a 4°C



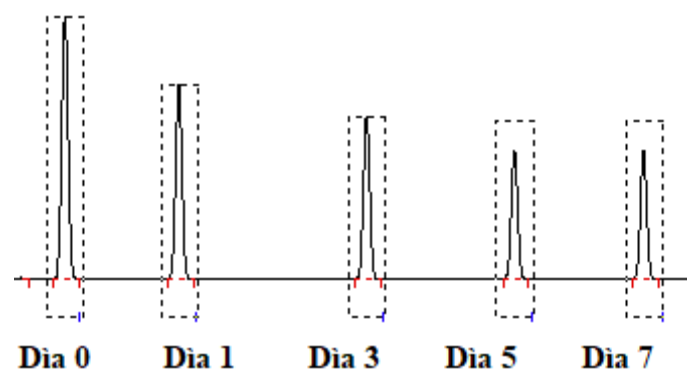
ANEXO F: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C2 a 4°C



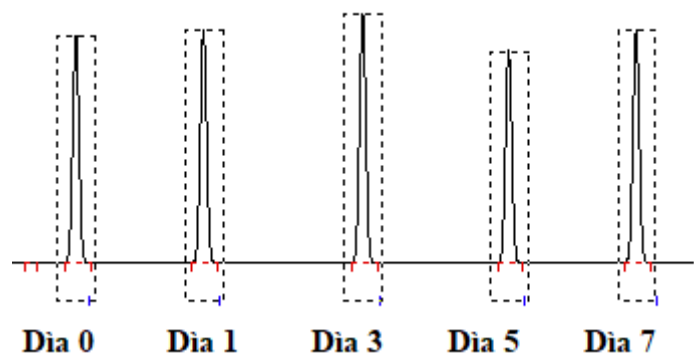
ANEXO G: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A3 a 18°C



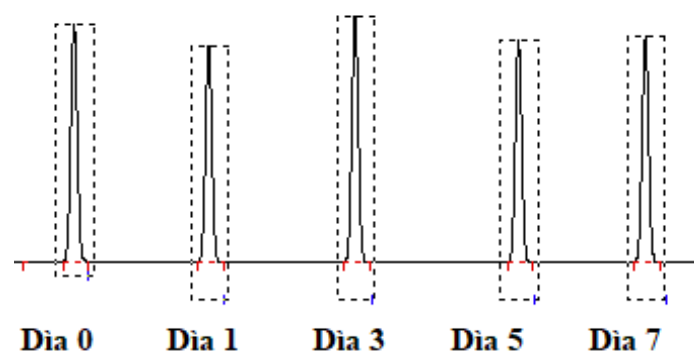
ANEXO H: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE A4 a 18°C



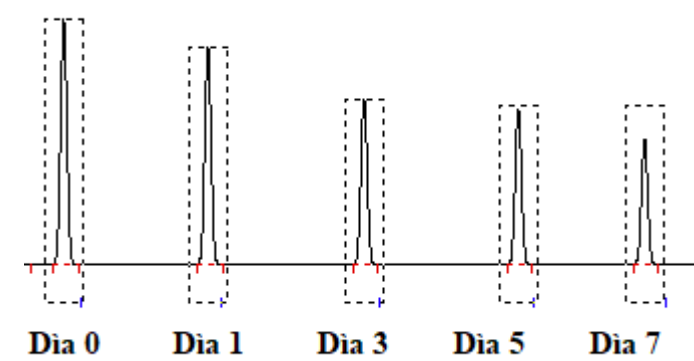
ANEXO I: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B3 a 18°C



ANEXO J: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE B4 a 18°C



ANEXO K: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C3 a 18°C



ANEXO L: SELECCIÓN CROMATOGRAMAS RECIPIENTE C4 a 18°C

