Evaluación y control simultáneo de 21 aminas, empleando orina como indicador biológico de exposición

Beatriz Jurado
Doctora en Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba.
Evaristo Ballesteros
Profesor Titular del Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Jaén.
Mercedes Gallego
Catedrática del Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba.
Rosa Montero
Doctora en Ciencias Químicas. Directora del Centro de Prevención de Riesgos Laborales de Córdoba, Consejería de Empleo, Junta de Andalucía (rosam.montero@juntadeandalucia.es)

La legislación española sobre Prevención de Riesgos Laborales regula la exposición de los trabajadores a numerosos agentes cancerígenos y mutágenos en el trabajo. Sin embargo, existen nuevas fuentes de agentes químicos (aminas) relacionadas con la salud laboral que, aunque muy restringido su uso por las propiedades cancerígenas que presentan muchas de ellas, son empleadas extensamente en la industria y en la agricultura. Este estudio aborda por primera vez la exposición de hasta 20 aminas en trabajadores de laboratorios (investigadores), estableciéndose las curvas de excreción de cada amina tras la exposición individual y el tiempo necesario para su eliminación completa del organismo. (*)

1.- INTRODUCCIÓN

Desde hace más de cincuenta años en el campo de la salud laboral se trabaja en el establecimiento de límites de exposición para agentes químicos en el ambiente laboral, medidos tanto en el aire que respiran los trabajadores (Valores límite ambientales) como en sus fluidos biológicos (Valores límite biológicos), para poder comparar las concentraciones halladas con una referencia que nos indique las medidas a tomar en los puestos de trabajo con el fin de preservar la salud de los trabajadores. Dentro de los valores límite biológicos se debe establecer una distinción entre descubrir efectos tóxicos y el control biológico de la exposición. El control biológico pretende descubrir las situaciones de riesgo para la salud del trabajador, por una exposición excesiva, mientras que otro tipo de controles médicos pretenden detectar las manifestaciones clínicas cuando ya han tenido lugar los efectos en el organismo del trabajador [1].

La Directiva 98/24/CE [2] y su correspondiente transposición a la normativa española a través del Real Decreto 374/2001 establecen una serie de valores límite para la exposición de trabajadores a agentes químicos en el ambiente laboral, así como la prohibición de uso de una serie de agentes químicos en el ambiente laboral: 2-naftilamina y sus sales, 4-aminidifenilo y sus sales, bencidina

(*) Este artículo ha sido subvencionado por el Proyecto SC/UNI/00007/2009 concedido por la Consejería de Empleo de la Junta de Andalucía

y sus sales y 4-nitrodifenilo, en cualquier actividad [3].

Dichos límites son publicados anualmente en el documento "Límites de exposición profesional para agentes químicos en España" [4]. En él se incluye la actualización de Valores Límite Ambientales para nuevos compuestos químicos tanto volátiles como no volátiles y la adopción e incorporación de nuevos Valores Límite Biológicos para varios compuestos. En relación con los agentes químicos existen tres directivas que establecen valores límite de exposición laboral (IOELVs) indicativos, todos ellos son valores límite de exposición ambiental [5–7]. Los Estados miembros de la UE establecerán valores límite de exposición profesional nacionales para los agentes químicos que figuran en dichas directivas, tomando en consideración los valores comunitarios.

El nuevo reglamento para el registro de sustancias (REACH) y el sistema global armonizado (SGA) proporcionará nuevos puntos de vista de la seguridad y la salud en el trabajo. Se estima que en España el REACH podría evitar cada año unos 7.000 casos de enfermedades profesionales respiratorias y de la piel. Recientemente se ha puesto de manifiesto que existen más de 3.000 sustancias peligrosas que se deberían eliminar o sustituir por otras; el objetivo clave sería evaluar y prevenir el riesgo químico. El Real Decreto 665/1997 y sus dos modificaciones posteriores (RD 1124/2000 y RD 349/2003) regulan la exposición de los trabajadores a estos agentes cancerígenos y mutágenos en el trabajo, fijando nuevos valores límite de exposición para algunos compuestos. Además se contempla la determinación y control de estos agentes aunque su presencia no sea debida a la actividad laboral y sí sea una consecuencia del diseño, instalación, mantenimiento o utilización de los locales o espacios en los que haya personas trabajando [8-10]. En este sentido, tanto la autoridad laboral española, a través del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), como en otros países, a través de sus órganos técnicos, tienen establecidos los límites de exposición profesional a agentes químicos, aunque hay casos de agentes químicos que carecen de los mismos, como ocurre con algunas aminas [4].

Existe una serie de compuestos químicos como son las aminas que, aunque muy restringido su uso por las propiedades cancerígenas que presentan muchas de ellas, son empleadas extensamente en la industria y en la agricultura. Las aminas se pueden clasificar en diversos grupos: alifáticas, aromáticas, heterocíclicas y nitrosaminas. Las aminas alifáticas no son tóxicas, pero su estudio puede ser relevante ya que actúan como precursoras de las nitrosaminas que sí lo son. En cambio las aminas aromáticas (anilinas, cloroanilinas y nitroanilinas) son sustancias tóxicas y cancerígenas que aparecen en el medio ambiente representando un grupo de riesgo al ser usadas en procesos industriales tales como la tinción de tejidos y cuero, como productos intermedios de colorantes y en la producción de fármacos, plaguicidas y plásticos o bien como productos de degradación de plaguicidas y colorantes industriales como ocurre con las cloroanilinas [11,12].

Dado su carácter cancerígeno la Unión Europea ha incluido a varias de estas aminas aromáticas en la lista prioritaria de contaminantes químicos [13]. También hay un grupo de agentes específicos entre los que se encuentran el amianto, los disolventes organoclorados, los plaguicidas, las radiaciones ionizantes y las anilinas que se han señalado como candidatos a aumentar el riesgo de cáncer de páncreas [14].

Cabe destacar un grupo interesante de aminas constituido por las N-nitrosaminas (NAms) porque son carcinogénicas y se asocia a una mayor incidencia con el cáncer de estómago, esófago e hígado; se encuentran en las aguas como

productos de desinfección, originados por la reacción entre la materia orgánica y los nitratos contenidos en el agua, y el cloro usado para su desinfección [15]. Las NAms se incluyen en los sistemas de información de Riesgos (IRIS) de la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA), estableciendo las concentraciones de riesgo en el intervalo entre 2 y 200 ng/l (NAms alifáticas) a un nivel de riesgo estimado de desarrollo de cáncer por exposición oral de 10^{-5} [16]. Los efectos tóxicos de las NAms se explican por su capacidad de formar agentes alquilantes electrofílicos que pueden reaccionar con los sitios nucleófilicos de macromoléculas como ADN, ARN y proteínas, produciendo mutaciones y originando cáncer [17]. Estos contaminantes ambientales se encuentran en la atmósfera, en la tierra y en las aguas superficiales cuando se descargan efluentes industriales en las mismas. Toda la población está expuesta a estos compuestos en mayor o en menor grado ya que puede absorberse por todas las vías: piel, pulmón y tracto gastrointestinal. Sin embargo, dentro del contexto de la prevención de riesgos laborales resulta de gran interés el estudio de la exposición a aminas por inhalación y por vía dérmica. Dependiendo de su estructura química y rutas metabólicas, las aminas aromáticas pueden inducir efectos tóxicos diversos, como producción de metahemoglobina y sulfametahemoglobina, anemia hemólitica y plástica, daño hepático y renal, reacciones alérgicas, efectos mutagénicos y carcinogénicos, interferencia con el aparato reproductor y efectos teratogénicos.

La monitorización biológica está considerada como la más efectiva cuando se trata de exposición laboral a compuestos orgánicos volátiles [18]. La determinación de aminas aromáticas y/o sus metabolitos, recogida durante el periodo de exposición, puede representar en ciertas circunstancias un método válido para evaluar la absorción; sin embargo, excepto para un metabolito de la anilina (p-aminofenol) las relaciones entre la absorción de aminas específicas y su concentración en orina son aún desconocidas [19]. Existen escasísimos estudios sobre este tipo de compuestos y se trata de aportaciones esporádicas. Así, se han determinado concentraciones de NAms en fluidos biológicos en trabajadores de industrias de caucho [20], en orina de trabajadores del metal expuestos a N-nitrosodietanolamina [21] y de aminas aromáticas en atmósfera industrial [22]. En cualquier caso existe insuficiente información sobre las relaciones entre la incorporación al organismo de aminas específicas y su concentración en orina o entre este parámetro y su efecto sobre la salud. Solo para anilina se sabe que una exposición de 8 horas a concentraciones de 5 mg/m^3 en el aire da como resultado 35 mg de p-aminofenol en orina en las 24 horas siguientes a la exposición (OMS,1986) [19]. Se ha recomendado en Alemania que la concentración de anilina libre en orina no debería exceder de 1 mg/l (final del turno).

Las aminas y sus metabolitos se excretan principalmente por la orina; solo en algunos de ellos (anilina) es posible la secreción gástrica. Estos compuestos pueden ser cuantificados en orina normalmente por cromatografía de gases y/o de líquidos. Para llevar a cabo el presente estudio se han analizado muestras de orina de investigadores que están expuestos a numerosas aminas (más de 20) porque participan en un proyecto de investigación sobre nuevos avances en el desarrollo de la miniaturización para el análisis de aminas o bien porque utilizan espacios comunes en los que se trabaja con estas aminas. No existen metodologías para la determinación simultánea de tantas familias de aminas en orina y a concentraciones tan bajas (ng/l), por lo que se ha desarrollado un nuevo método antes de proceder a la evaluación de la exposición. Lo primero que se ha abordado es establecer las curvas de excreción de cada amina tras la exposición individual a cada una de ellas por los mismos investigadores, con vistas a conocer el tiempo de vida media de las mismas y seleccionar el tiempo de toma de muestra. Otro objetivo ha sido conocer

el tiempo necesario para la eliminación completa de las aminas del organismo tras exposiciones prolongadas y si existe sinergia entre ellas. Es evidente que se trata de una información privilegiada ya que es poco probable que un trabajador esté expuesto simultáneamente a más de 20 aminas, por lo que es un trabajo pionero a nivel internacional que se ha realizado a lo largo de dos años. También se ha pretendido poner de manifiesto nuevas fuentes de agentes químicos (aminas) relacionados con la salud laboral (personal investigador en este caso pero extrapolable a trabajadores de la industria), con objeto de sensibilizar a los organismos pertinentes para iniciar acciones sobre las mismas.

2.- MATERIAL Y MÉTODO

El trabajo de investigación se ha llevado a cabo en laboratorios de las universidades de Córdoba y de Jaén en las que trabajan más de 10 investigadores. Dos de ellos manipulan estos compuestos individualmente, con una frecuencia máxima de una amina a la semana, tomando el compuesto de patrones puros, para preparar disoluciones a niveles de gramos por litro. Por lo tanto, estos investigadores solo se exponen a una amina a altas concentraciones que permite establecer las curvas de excreción.

Otros cuatro investigadores realizan sus tesis doctorales sobre estos compuestos y preparan diariamente disoluciones diludas conteniendo las 21 aminas a partir de las disoluciones madre, en concentraciones bajas (del orden de miligramos o microgramos por litro), todos ellos son por lo tanto una población de riesgo, expuestos a todas las aminas reflejadas en este trabajo.

De los 10 investigadores, los cuatro restantes no están en contacto directo con estos productos químicos pero comparten las instalaciones y espacios con los anteriores y, por lo tanto, también podrían ser una población de riesgo.

Todos los participantes han colaborado voluntariamente. De estos 10 investigadores el 70% son mujeres. Las edades de todos ellos varían, siendo la media de 27 ± 3 años. El índice de masa corporal para todos ellos corresponde a personas de complexión delgada, a excepción de dos de ellas.

Los dos años en estudio han cubierto el periodo 2008/2010.

La toma de muestra de la orina de los investigadores se llevó a cabo antes y después de la manipulación de aminas individuales a niveles de gramos o bien de la manipulación conjunta de las 21 aminas a niveles de miligramos o microgramos durante la preparación de disoluciones estándares. Para evaluar la exposición laboral en jornadas diarias de 8 horas, se tomaron muestras antes y después de finalizar cada jornada. En el caso de los investigadores más expuestos (investigadores 1 y 2), la toma de muestra de orina se realizó un día a la semana, en los días que se preparaba una disolución concentrada de una amina concreta a niveles de g/l, manipulando/pesando las aminas en balanzas analíticas situadas en dependencias sin campanas extractoras pero siempre provistos de mascarillas con filtros de carbono grafitizado, batas y guantes de látex. En varios investigadores (investigadores 3–6) también se tomaron muestras de orina al finalizar la jornada laboral cuando preparaban disoluciones diluidas de las 21 aminas en campanas extractoras, provistos de mascarillas, batas y guantes de látex. En relación con los cuatro investigadores no expuestos directamente pero que compartían las instalaciones o espacios con los investigadores anteriores, las muestras de orina se tomaron antes de iniciar su jornada laboral y al finalizar la misma (al menos 2-3 veces al mes). Todos los voluntarios estudiados consumieron agua mineral como única bebida durante los días de toma de orina, ya que ésta no contiene aminas como subproductos de desinfección y, por lo tanto, los incrementos de la concentración de aminas en la orina de las personas expuestas se asignan exclusivamente a la contaminación en el laboratorio. La posible contaminación alimentaria se controló estudiando cinco trabajadores de otros laboratorios de la universidad (personas no expuestas a aminas), con similares hábitos alimentarios que los investigadores expuestos, cuyas orinas se toman como blancos.

Las muestras de orina para medir la exposición a aminas se tomaron en recipientes de polietileno de 100 ml, sin dejar espacio de cabeza y cerrándose herméticamente. Las muestras se tomaron en un lugar libre de exposición a aminas, fuera de las dependencias del laboratorio, para evitar la posible contaminación de las mismas. Las muestras se analizaron inmediatamente por triplicado o bien se almacenaron en frigorífico (4 °C) hasta un máximo de 48 horas; en el caso de que no fuera posible su análisis inmediato, la orina se puede conservar congelada a -20 °C hasta un máximo de un mes en los mismos recipientes de muestreo. En este caso las muestras se descongelaron completamente a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis.

Para la determinación de aminas en orina se introducen 25 ml de muestra en matraces de PTFE de 50 ml a los que se les añade 2,5 ml de ácido clorhídrico 11 Molar y se sella herméticamente. La muestra acidificada se hidroliza en un horno de microondas casero a 350 W durante dos minutos para liberar a las aminas aromáticas que se encuentran conjugadas (las restantes aminas no requieren este tratamiento pero, al

no afectarse por el mismo, se realiza un tratamiento conjunto para la detección simultánea de las 21 aminas). Una vez fría, la muestra hidrolizada se preconcentra en una unidad automática de extracción en fase sólida (SPE). El sistema SPE consiste en una bomba peristáltica para impulsar los líquidos, una minicolumna sorbente empaquetada con 75 mg de LiChrolut EN y una válvula de inyección por la que se introduce 150 µl de eluyente (acetato de etilo con el estándar interno). Una vez obtenido el extracto orgánico, alícuotas de 1 µl se inyecta en un cromatógrafo de gases. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Thermo Electron Focus equipado con un espectrómetro de masas DSQ II como detector, controlado por un ordenador (software XCalibur). El cromatógrafo cuenta con una columna capilar DB-5MS de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase estacionaria líquida. El programa de temperaturas seleccionado permitió la separación de las 21 aminas contempladas en este trabajo, con alta resolución, y el empleo del espectrómetro de masas la identificación inequívoca de cada una de ellas. Se operó en modo SIM seleccionándose el pico de mayor abundancia y de acuerdo con el criterio de especificidad (40-326 amu). El método desarrollado es el más sensible descrito hasta la fecha para determinar simultáneamente aminas alifáticas, aromáticas y N-nitrosaminas en orina (límites de detección entre 2 y 25 ppt), está miniaturizado y es preciso y rápido.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La formación endógena de N-nitrosaminas en personas expuestas ha sido estudiada por varios investigadores que se han basado en la determinación de los niveles de excreción de estos compuestos en la orina, detectándose N-nitrosodimetilamina, N-nitrosomorfolina y N-nitrosopiperidina en muestras analizadas con excreciones medias de 214, 464 y 69 ng al día, respectivamente [23,24]. Por otro lado los niveles de las 3,4- y 3,5-dicloroanilinas han sido monitorizados como marcadores comunes de plaguicidas (derivadas del metabolismo de estos tóxicos en el cuerpo humano) en el intervalo entre 0,01 y 6,7 mg/l [25]. Otros investigadores también han encontrado anilina y otras cloroanilinas como la 3- y 4-cloroanilina y la 3,4- y 3,5-dicloroanilina en orina humana a niveles entre 0,05 y 3,5 µg/l [11].

Tabla 1 Valores de constantes de velocidad de excreción (k) y tiempo de vida medio biológico ($t_{1/2}$) de N-nitrosaminas y aminas aromáticas en muestras de orina de dos investigadores (1 y 2), 15 minutos después de preparar una disolución concentrada de una amina patrón concreta a niveles de g/l, con una frecuencia de 1 día a la semana

AMINA	INVESTIGADOR 1		INVESTIGADOR 2	
	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
N-Nitrosaminas				
N-Nitrosodimetilamina	0,407	1,70	0,410	1,64
N-Nitrosodietilamina	0,348	1,99	nd	nd
N-Nitrosodibutilamina	0,352	1,97	0,343	2,02
N-Nitrosodifenilamina	0,336	2,06	0,329	2,10
N-Nitrosodimetilanilina	0,442	1,56	0,399	1,73
N-Nitrosodietilanilina	0,369	1,88	nd	nd
Aminas Aromáticas				
Anilina	0,267	2,59	nd	nd
2-Cloroanilina	0,378	1,83	0,353	1,96
3-Cloroanilina	0,417	1,66	0,398	1,74
4-Cloroanilina	0,385	1,80	0,375	1,84
2,3-Dicloroanilina	0,413	1,68	0,425	1,63
2,4-Dicloroanilina	0,444	1,56	0,430	1,61
2,5- Dicloroanilina	0,518	1,33	0,439	1,57
2,6- Dicloroanilina	0,379	1,83	nd	nd
3,4- Dicloroanilina	0,385	1,78	0,375	1,84
3,5- Dicloroanilina	0,436	1,59	0,416	1,66
2,4,5-Tricloroanilina	0,381	1,82	nd	nd
2,4,6-Tricloroanilina	0,455	1,52	0,462	1,50
3,4,5-Tricloroanilina	0,430	1,61	0,416	1,66
2-Nitroanilina	0,396	1,75	0,382	1,81
4-Nitroanilina	0,386	1,79	0,389	1,78

(*) nd: no detectado

En este estudio se ha evaluado por primera vez la exposición simultánea a 21 aminas (alifáticas y aromáticas) y N-nitrosaminas en el lugar de trabajo mediante el estudio de la orina de investigadores que han manipulado estos compuestos o bien comparten las instalaciones con los que las manipulan.

En primer lugar se estudió la cinética de excreción de estas aminas en la orina de dos investigadores que trabajaban con estos compuestos durante la

Tabla 2 Concentraciones (ng/l) de aminas encontradas en la orina de investigadores 15 minutos después de preparar una disolución concentrada de una amina patrón concreta a niveles de g/l, con una frecuencia de 1 día a la semana (investigadores 1 y 2) y al finalizar la jornada laboral de 8 horas cuando preparaban disoluciones diluidas de las 21 aminas varias veces en el día (investigadores 3-6)

AMINA	INVEST. 1	INVEST. 2	INVEST. 3	INVEST. 4	INVEST. 5	INVEST. 6
N-Nitrosodimetilamina	85	90	40	35	30	30
N-Nitrosodietilamina	40	nd	nd	nd	nd	nd
N-Nitrosodibutilamina	90	95	nd	nd	nd	nd
N-Nitrosodifenilamina	80	85	nd	nd	nd	nd
N-Nitrosodimetilanilina	155	185	nd	nd	nd	nd
N-Nitrosodietilanilina	185	nd	nd	nd	nd	nd
Anilina	45	50	20	nd	nd	nd
2-Cloroanilina	20	25	nd	nd	nd	nd
3-Cloroanilina	45	40	nd	nd	nd	nd
4-Cloroanilina	80	85	35	25	30	15
2,3-Dicloroanilina	260	310	60	65	nd	50
2,4-Dicloroanilina	155	210	nd	nd	nd	nd
2,5-Dicloroanilina	270	525	40	34	35	45
2,6-Dicloroanilina	200	nd	nd	nd	nd	nd
3,4-Dicloroanilina	270	290	95	100	90	75
3,5-Dicloroanilina	400	265	95	nd	nd	nd
2,4,5-Tricloroanilina	100	nd	nd	nd	nd	nd
2,4,6-Tricloroanilina	135	160	nd	nd	nd	nd
3,4,5-Tricloroanilina	280	220	70	55	50	100
2-Nitroanilina	145	160	nd	nd	nd	nd
4-Nitroanilina	220	190	nd	nd	nd	nd

(*) nd: no detectado

manipulación individual de cada amina un día por semana para preparar disoluciones estándares a concentraciones de g/l en metanol, con el fin de seleccionar el tiempo óptimo para la recogida de la muestra y para evaluar el proceso de eliminación. Para ello se tomaron varias muestras de orina antes de la exposición y con un intervalo de tiempo de 0 minutos; la muestra recogida a los 15 minutos después de la exposición (tiempo mínimo para salir del laboratorio y tomar la muestra) se considera como la muestra de inicio en el momento 0. Los resultados obtenidos se han plasmado en la Tabla 1.

En segundo lugar se estudiaron las concentraciones de las 21 aminas manipuladas por los seis investigadores que trabajaban simultáneamente con ellas con una frecuencia de entre dos y cinco días a la semana y a niveles de miligramos, durante jornadas laborales de 8 horas. Las tomas de muestras de orina se realizaron antes de la exposición y a intervalos de tiempo de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 h después de la exposición, para su posterior análisis. La muestra recogida a los 15 minutos después de la exposición, al igual que en el estudio de la cinética, se considera como la muestra de inicio en el momento 0 y para las muestras posteriores se ha tenido en cuenta el tiempo anterior como referencia. De los resultados obtenidos de la eliminación de estos compuestos en el conjunto de muestras analizadas se puede concluir que existe una excreción inicial rápida para las 21 aminas al cese de la exposición/absorción que decrece con el tiempo, alcanzándose valores mínimos estables unas 6 horas después de la misma. Podemos ver los resultados obtenidos en la Tabla 2.

A modo de ejemplo se visualizan en el Gráfico 1 las curvas cinéticas de excreción para las aminas que tienen límites de exposición asignados, ya sean ambientales y/o biológicos en el documento "Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2010" [4] (anilina, 4-cloroanilina, 2,4-dicloroanilina, 2-nitroanilina, y 4-nitroanilina). (Tablas 3 y 4). La 3,4-dicloroanilina aparece con restricciones de uso en la fabricación de herbicidas en la Recomendación de la Comisión de 11 de abril de 2006 [26].

En todos los casos las curvas de excreción se corresponden con ecuaciones cinéticas de primer orden, la cual se puede ajustar a la función exponencial, $y = y_0 + A \times \exp(-kt)$. La constante de velocidad de eliminación (k) indica la fracción de contaminante eliminada por unidad de tiempo. El tiempo de vida media biológica ($t_{1/2}$) de un xenobiótico en un órgano, tejido o fluido corporal indica el tiempo necesario para reducir el nivel biológico de la sustancia tóxica a la mitad, que es inversamente proporcional a la constante de eliminación ($k=\ln 2/t_{1/2}$). Los resultados obtenidos fueron similares en los dos investigadores estudiados durante la manipulación individual de las 21 aminas a lo largo de dos años. Aunque

Tabla 3 Límites de exposición ambiental de aminas manipuladas por el personal investigador del laboratorio

	LÍMITES DE EXPOSICIÓN AMBIENTAL PARA AGENTES QUÍMICOS			
AMINA	VALOR LÍMITE AMBIENTAL (VLA) 2010 (1)			
	EXPOSICIÓN DIARIA (ED)		EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN (EC)	NOTACIONES
	ppm	mg/m³		
Anilina	2	7,7	NO	Vía dérmica
4-Cloroanilina	C2 (2)		NO	Sensibilizante, Restricciones (3)
2-Nitroanilina		3	NO	Vía dérmica
4-Nitroanilina		3	NO	Vía dérmica
	PERMISSIVE EXPOSURE LIMIT (OSHA-PEL) 2009 (4) (5)			
	EXPOSICIÓN DIARIA (TLV-TWA) (6)		EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN (TLV-STEL) (7)	NOTACIONES
	ppm	mg/m³		
Anilina	5	19	NO	Vía dérmica
4-Nitroanilina	1	6	NO	Vía dérmica
N-Nitrosodimetilamina	Carcinogénico		NO	Vía dérmica
	RECOMMENDATED EXPOSURE LIMIT (NIOSH-REL) 2009 (4) (8)			
	EXPOSICIÓN DIARIA (TLV-TWA) (6)		EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN (TLV-STEL) (7)	NOTACIONES
	ppm	mg/m³		
Anilina	Carcinogénico		NO	Vía dérmica
4-Nitroanilina		3	NO	Vía dérmica
N-Nitrosodimetilamina	Carcinogénico		NO	Vía dérmica
	Recomendación de la Comisión, de 11 de abril de 2006 (9)			
3,4-Dicloroanilina	Limitaciones en su uso			

(1) Documento "Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2010" [4]
(2) Sustancia carcinogénica de segunda categoría. "Sustancias que pueden considerarse como carcinogénicas para el hombre. Se dispone de suficientes elementos para suponer que la exposición del hombre a tales sustancias puede producir cáncer. Dicha presunción se fundamenta generalmente en: a) estudios apropiados a largo plazo en animales; b) otro tipo de información pertinente". Le es de aplicación el RD 665/1997.
(3) Esta sustancia tiene establecidas restricciones a la fabricación, la comercialización o el uso en los términos especificados en el "Reglamento CE 1907/2006 sobre registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y preparados químicos (REACH), de 18 de diciembre de 2006" (DOUE L 369, 30/12/2006). Las restricciones de una sustancia pueden aplicarse a todos los usos o sólo a usos concretos. El Anexo XVII del reglamento REACH contiene la lista de todas las sustancias restringidas y especifica los usos que se han restringido.
(4) Poket Guide, NIOSH publication 2005-149, revisada 3/2/2009.
(5) PEL: Permissive exposure Level, nivel de exposición permitido según Occupational Safety and Health Administration (USA) [OSHA].
(6) TLV-TWA. Thershold limit value – Time weighted average. Valor límite ambiental para una exposición de tiempo ponderada, exposición diaria de 8 horas
(7) TLV-STEL. Thershold limit value – Short-Term Exposure Limit. Valor límite ambiental para exposiciones de corta duración.
(8) REL: Recommended exposure Level, nivel de exposición recomendado según Nacional Institute of Occupational Safety and Health (USA) [NIOSH].
(9) Recomendación de la Comisión, de 11 de abril de 2006, en materia de medidas de reducción del riesgo de las siguientes sustancias: ftalato de dibutilo; 3,4-dicloroanilina; ftalato de diisodecilo; ácido 1,2-bencenodicarboxílico; ésteres dialquílicos ramificados de C 9-11, ricos en C10; ftalato de di-isononilo; ácido 1,2-bencenodicarboxílico; ésteres dialquílicos ramificados de C 8-10, ricos en C9; ácido etilendiaminotetracético; acetato de metilo; ácido monocloracético, n-pentano; etilendiaminotetraacetato de tetrasodio. (Diario oficial nº L 104 de 13/4/2006, p. 45).

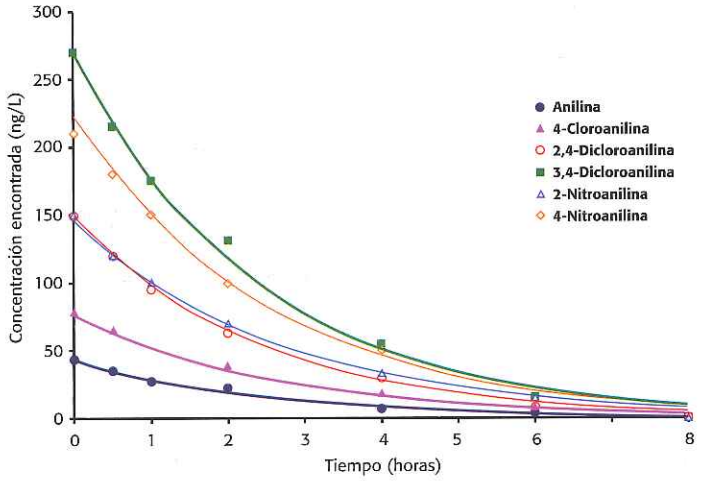
en el Gráfico 1 solo se indican las curvas de las seis aminas que tienen límites de exposición asignados, la de las restantes aminas estudiadas también se ajustan a una cinética de primer orden. Los valores medios, para cuatro determinaciones individuales, de las constantes de velocidad de excreción así como los tiempos de vida media biológicos se incluyen en la Tabla 1. De acuerdo con los valores de k (~ 0,38 horas^{-1}), los tiempos de vida media de las N-nitrosaminas (valor medio 1,9 h) son ligeramente superiores a los de las aminas aromáticas a excepción de la anilina (2,6 horas). Por otra parte, en el Gráfico 1 también se observa que los niveles más altos para todas las aminas se detectaron inmediatamente después de la exposición (el tiempo mínimo requerido para la toma de orina es de unos 15 minutos), disminuyendo rápidamente a niveles no cuantificables unas 6 horas aproximadamente después de la manipulación de aminas a niveles de

Tabla 4 Limites de exposición biológicos de las aminas que ha manipulado el personal investigador del laboratorio y aparecen en el documento "Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2010" [4].

AMINA	INDICADOR BIOLÓGICO (IB)	VALOR LÍMITE BIOLÓGICO (VLB)	MOMENTO DEL MUESTREO	NOTAS
Anilina	p-Aminofenol	50 mg/g de creatinina	Final de jornada laboral (1)	Fondo (2), I (3), S (4), con hidrólisis (5)
4-Cloroanilina	NO	NO		
2-Nitroanilina	Metahemoglobina en sangre	1,5% de metahemoglobina en hemoglobina total	Final de jornada laboral (1)	Fondo (2), I (3), S (4)
4-Nitroanilina	Metahemoglobina en sangre	1,5% de metahemoglobina en hemoglobina total	Final de jornada laboral (1)	Fondo (2), I (3), S (4)

(1) Cuando el final de la exposición no coincida con el final de la jornada laboral, la muestra se tomará lo antes posible tras el cese de la exposición real.
(2) Fondo: el indicador está generalmente presente en cantidades detectables en personas no expuestas laboralmente. Estos niveles de fondo están considerados en el valor VLB.
(3) I: indica que el determinante es inespecífico puesto que puede encontrarse después de la exposición a otros agentes químicos.
(4) S: significa que el determinante biológico es un indicador de exposición al agente en cuestión, pero la interpretación cuantitativa de su medida es ambigua (semicuantitativa).
(5) El metabolito tiene que determinarse después de hidrolizar la muestra.

Gráfico 1 Curva cinética de eliminación de 6 aminas en orina durante 8 horas, correspondientes al investigador 1, después de una exposición de 30 minutos (absorción)



gramos. Por lo tanto, se puede concluir que la toma de muestra ha de hacerse inmediatamente después del cese de la exposición, en un intervalo de 15-30 minutos, como máximo, pues los niveles de aminas encontradas en orina decrecen rápidamente. Esto se debe a que la vía de entrada principal es la inhalatoria, considerando la volatilidad de estos compuestos, seguida de la dérmica, pues la ingestión se descarta.

A continuación se evaluó la exposición a aminas aromáticas y N-nitrosaminas mediante el análisis de muestras de seis investigadores (por triplicado) en el momento de preparar disoluciones individuales de estos compuestos a niveles de gramos por litro en días diferentes o bien disoluciones conjuntas de las 21 aminas más diluidas, a niveles de miligramos o microgramos por litro. La toma de muestra se realizó unos 15 minutos después de la manipulación de elevadas cantidades (gramos de aminas) o bien al finalizar la jornada de trabajo cuando se manipulaban las 21 aminas simultáneamente. De acuerdo con la Tabla 2, cuando se manipulan cantidades de aminas a niveles de gramos, todas las aminas (salvo alguna excepción) se encuentran en la orina de los investigadores 1 y 2 rápidamente, siendo los compuestos que se encuentran a concentraciones más elevadas (más de 150 ng/l) la N-nitrosodimetilanilina y la N-nitrosodietilanilina, todas las dicloroanilinas, la 3,4,5-tricloroanilina y la 4-nitroanilina. Si nos centramos en los otros cuatro investigadores (del 3 al 6 en la Tabla 2) que manipulan todas las aminas simultáneamente, los datos son más relevantes y se puede obtener información de cuales se absorben en mayor proporción de acuerdo con su volatilidad. Así, en ninguno de estos cuatro investigadores (a lo largo de dos años) se detectaron la mayoría de las N-nitrosaminas y cloroanilinas; tampo-

co se detectaron algunas dicloroanilinas y ninguna nitroanilina. De las aminas o N-nitrosaminas encontradas todas se hallan a concentraciones muy bajas, del orden de 30-50 ng/l (salvo la 3,4-dicloroanilina, que es la que más se absorbe al ser muy volátil), lo cual es indicativo de que aunque se trabaje con esta aminas simultáneamente, siempre que se haga a concentraciones bajas, el riesgo de contaminación es mínimo. Cabe resaltar que la anilina no suele detectarse y cuando se encuentra en orina sus concentraciones son muy inferiores a las establecidas como tóxicas (1 mg/l). Por otra parte, es importante indicar que no se detectó ninguna amina en la orina de los cuatro investigadores no expuestos directamente (no trabajaban con aminas) pero que compartían las instalaciones o espacios con los investigadores anteriores, ni en los cinco trabajadores de otros laboratorios de la universidad (personas no expuestas a aminas), con similares hábitos alimentarios que los investigadores expuestos y cuyas orinas se toman como blancos. Por esta razón, ninguno de ellos se ha incluido en la Tabla 2. Por lo tanto, se puede concluir que:

1. la presencia de estas aminas en la orina se debe a la exposición durante la manipulación de las mismas para la preparación de disoluciones a niveles de g/l fundamentalmente;

2. cuando se manipulan disoluciones diluidas de las 21 aminas conjuntamente pero a concentraciones bajas, ppm o ppb, la contaminación después de una jornada de trabajo de 8 horas es poco significativa;

3. personas que no manipulan aminas pero comparten las instalaciones o espacio con los investigadores que están en contacto directo con ellas no se contaminan; y

4. las aminas no provienen de los alimentos, ni tienen formación endógena ya que todas las muestras de orina procedían de investigadores con los mismos hábitos de alimentación y los que no estaban expuestos no contienen estas aminas en la orina.

4.- CONCLUSIONES

Actualmente los indicadores biológicos asociados a la exposición a compuestos químicos han adquirido una gran importancia como complemento del control ambiental de la exposición laboral de los trabajadores. El control biológico da una idea mucho más próxima que la valoración ambiental porque permite comprobar la efectividad de los equipos de protección individual o para detectar una posible absorción dérmica además de la inhalatoria.

Existe escasa información sobre la absorción de aminas y en ningún caso se ha realizado un estudio sobre la exposición simultánea a 21 aminas aromáticas y N-nitrosaminas, que son las más tóxicas. El método desarrollado para la determinación de aminas sin modificar en orina es extraordinariamente sensible, lo que permite la determinación de las mismas a niveles de ppt en su estado nativo, es decir, sin modificar, lo que ofrece enormes ventajas; no es correcto afirmar que los metabolitos sean siempre fiables pues el tóxico nativo puede ser variable; la toma de muestra no es invasiva, como la sangre; los métodos cromatográficos acoplados a espectrómetros son los más sensibles y específicos; el tratamiento de la muestra se simplifica notablemente respecto a la determinación de los metabolitos.

El método aquí desarrollado ha permitido evaluar a los investigadores que han trabajado con las aminas en un período de dos años. Este caso es poco probable que se dé en la industria pero la información obtenida es muy valiosa.

Se ha puesto de manifiesto que la vía de entrada es principalmente la inhalatoria, la vía dérmica es mínima por emplear guantes y batas, a pesar de que los trabajadores empleaban siempre mascarillas y campanas extractoras, salvo en el momento de la pesada en las balanzas analíticas.

A partir de ahí surge una duda razonable: ¿Cómo es posible que estas mascarillas de protección no sean efectivas frente al riesgo de las aminas? La respuesta la hemos encontrado a partir de otros estudios anteriores y buscando en la bibliografía. Las mascarillas comerciales para la adsorción de compuestos orgánicos volátiles son poco efectivas para las aminas debido al tipo de sorbente que emplean: carbonos grafitizados. Esto se ha puesto de manifiesto en un estudio reciente con 4-cloroanilina [27] en el que se ha demostrado que las mascarillas comerciales no son efectivas para esta amina. Nosotros, además, en experimentos realizados para la adsorción de aminas en diversos materiales, hemos puesto de manifiesto que los carbonos grafitizados no son válidos para muchas aminas mientras que los materiales que adsorben en mayor proporción las aminas son los sorbentes poliméricos tipo Tenax TA y LiChrolut EN.

En este contexto, probablemente, sería necesario mejorar las medidas preventivas de los trabajadores desarrollando mascarillas rellenas de diferentes materiales sorbentes, de acuerdo con la actividad del trabajador y, por lo tanto, según los compuestos orgánicos que manipulen, sin menoscabo de formar a los trabajadores en unas buenas prácticas laborales de manera que cambien las mascarillas una vez que los materiales de relleno han alcanzado el volumen de ruptura y están saturados de los tóxicos. ●

Bibliografía

- Anguita, R., Entrena, Y. Control biológico de trabajadores expuestos a contaminantes químicos. La Mutua, Fraternidad – Muprespa, 4 (2001), 49–54.
- Directiva 98/24/CE del Consejo, de 7 de abril de 1998, relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo (decimocuarta Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE). (Diario oficial nº L 131 de 5/5/1998, p.11).
- Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. (BOE nº 104, 1/5/2001).
- Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2010. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Ministerio de Trabajo e Inmigración, Madrid, 2010.
- Directiva 2000/39/CE de la Comisión, de 28 de diciembre de 2000 por la que se establece la primera lista de valores límite de exposición profesional indicativos en aplicación de la Directiva 98/24/CE del Consejo. (Diario oficial nº L 142 de 16/6/2000, p.47).
- Directiva 2006/115/CE de la Comisión, de 7 de febrero de 2006, por la que se establece la segunda lista de valores límite de exposición profesional indicativos en aplicación de la Directiva 98/24/CE del Consejo y por la que se modifican las Directivas 91/322/CEE y 2000/39/CE de la Comisión. (Diario oficial nº L 38 de 9/2/2006, p.36).
- Directiva 2009/161/UE de la Comisión, de 17 de diciembre de 2009, por la que se establece una tercera lista de valores límite de exposición profesional indicativos en aplicación de la Directiva 98/24/CE del Consejo y por la que se modifica la Directiva 2000/39/CE de la Comisión. (Diario oficial nº L 338 de 19/12/2009, p.87).
- Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. (BOE nº 124, de 24/5/1997).
- Real Decreto 1124/2000, de 16 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. (BOE nº 145, de 17/6/2000).
- Real Decreto 349/2003, de 21 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo. (BOE nº 82, de 5/4/2003).
- Weis T., Angerer J. *Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. B 778 (2002) 179–192.
- Akyüz M. *Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in indoor and outdoor air samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Talanta 71 (2007) 486–492.
- Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo de 1976. Contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la comunidad. (Diario oficial nº L129, 18/5/1976, p.23).
- Aguacil J., Porta M., Malats N., Benavides F.G., Kogevinas M. Exposiciones laborales y cáncer de páncreas: una revisión bibliográfica internacional. Arch. Prev. Riesgos lab. 5 (2002) 21-29.
- Zhao Y.D., Boyd J.M, Woodbeck M., Andrews R.C, Qin F., Hrudey S.E., Li X.F. *Formation of N-nitrosamines from eleven disinfection treatments of seven different surface waters*. Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4857–4862.
- Iris Substance List, U.S. Environmental Protection Agency. http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm?fuseaction=iris.showSubstanceList. Acceso septiembre-2010.
- Hecht S.S. *Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 216 (1997) 181–191.
- Caro J., Gallego M., Montero R. Estado actual del control de la exposición a compuestos orgánicos volátiles en el medio laboral. *Seguridad y Salud en el Trabajo* 46 (2008) 10–19.
- Lauwerys R. Indicadores biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales: aminas aromáticas. Traducido por Villanueva Ballester V. *et al*, Generalitat Valenciana, *Conselleria de Sanitat*, Diele Ediciones, S.L., Valencia, 1995.
- Spiegelhalder B. *Occupational exposure to n-nitrosamines: air measurements and biological monitoring*. IARC Sci. Publ. 57 (1984) 937–942.
- Spiegelhalder B., Muller, J., Drasche, H., Preussmann, R. *N-nitrosodiethanolamine excretion in metal grinders*. IARC Sci. Publ. 84 (1987) 55–0552.
- Walker G.S., Atherton, J., Bauman J., Kohl C., Lam W., Reily M., Lou Z., Mutlib J.M.S. *Determination of degradation pathways and kinetics of acyl glucuronides by NMR spectroscopy*. Chem. Res. Toxicol. 20 (2007) 876–886.
- Van Maanen J.M.S., Pachen D.M.F.A., Dallinga J.W., Kleinjans J.C.S. *Formation of nitrosamines during consumption of nitrate- and amine-rich foods, and the influence of the use of mouthwashes*. Cancer Detec. Prev. 22 (1998) 204–212.
- Vermeer I.T.M., Pachen D.M.F.A., Dallinga J.W., Kleinjans J.C.S., Van Maanen J.M.S. *Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet*. Environ. Health Perspect. 106 (1998) 459–463.
- Turci R., Barisano A., Balducci C., Colosio C., Minoia C. *Determination of dichloroanilines in human urine by gas chromatography/mass spectrometry: Validation protocol and establishment of Reference Values in a population group living in central Italy*. Rapid Commun. Mass. Spectrom. 20 (2006) 2621–2625.
- Recomendación de la Comisión, de 11 de abril de 2006, en materia de medidas de reducción del riesgo de las siguientes sustancias: ftalato de dibutilo; 3,4-dicloroanilina; ftalato de diisodecilo; ácido 1,2-bencenodicarboxílico; ésteres dialquílicos ramificados de C 9-11, ricos en C10; ftalato de di-isononilo; ácido 1,2-bencenodicarboxílico; ésteres dialquílicos ramificados de C 8-10, ricos en C9; ácido etilendiaminotetracético; acetato de metilo; ácido monocloracético, n-pentano; etilendiaminotetraacetato de tetrasodio. (Diario oficial nº L 104 de 13/4/2006, p. 45)
- Pizon, A.F., Schwartz A.R., Shum L.M., Rittenberger J.C., Lower D.R., Giannoutsos S., Virji M.A., Krasowski M.D. *Toxicology laboratory analysis and human exposure to p-chloroaniline*. Clin. Toxicol. 47 (2009) 132-136.