



# Control biológico de la exposición laboral a contaminantes químicos mediante la determinación de compuestos sin metabolizar en orina

Dr.ª TERESA BORDA  
Unidad de Medicina Legal

CELIA PRADO BURGÍ  
Gabinete de Seguridad e Higiene

J. FRANCISCO PIÑERO y J. R. JIMÉNEZ  
Unidad de Medicina Legal de la Universidad de Murcia.  
Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Murcia)

## INTRODUCCIÓN

El control ambiental de la exposición laboral a contaminantes orgánicos está basado en la estimación de la dosis externa a partir de la evaluación de los niveles de concentración en aire de los mismos. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado procedimientos de control biológico que permiten estimar la dosis interna mediante la evaluación de indicadores específicos en diferentes fluidos biológicos. Este tipo de control ofrece un alto poder predictivo respecto al riesgo para la salud como consecuencia de la exposición a dichos contaminantes, puesto que nos proporciona una valoración de la respuesta individual frente a la misma.

El control biológico, que está basado en la determinación de indicadores específicos relacionados con la exposición, tiene en cuenta las diferencias interindividuales de absorción y meta-

## SUMARIO

*La posibilidad de medir directamente la excreción urinaria de compuestos orgánicos volátiles sin metabolizar ofrece una buena alternativa para el control biológico de la exposición a estos compuestos. La microextracción en fase sólida es una técnica que se ha desarrollado recientemente para el análisis de compuestos orgánicos en diferentes matrices. En este trabajo se presenta el estudio llevado a cabo sobre la aplicabilidad de la técnica de microextracción en fase sólida-cromatografía de gases para el control biológico de estireno en orina.*

**Palabras clave:** control biológico, orina, compuestos orgánicos, microextracción en fase sólida.

Este artículo  
de la Universidad

del trabajo presentado  
ajo el patrocinio de la F

io resultado final de la I  
MAPFRE, en su Conv

estigación desarrollada  
ria 1997-1998.

Madrid, 1998

bolización, así como otras vías de entrada distintas a la inhalatoria, como puede ser la dérmica.

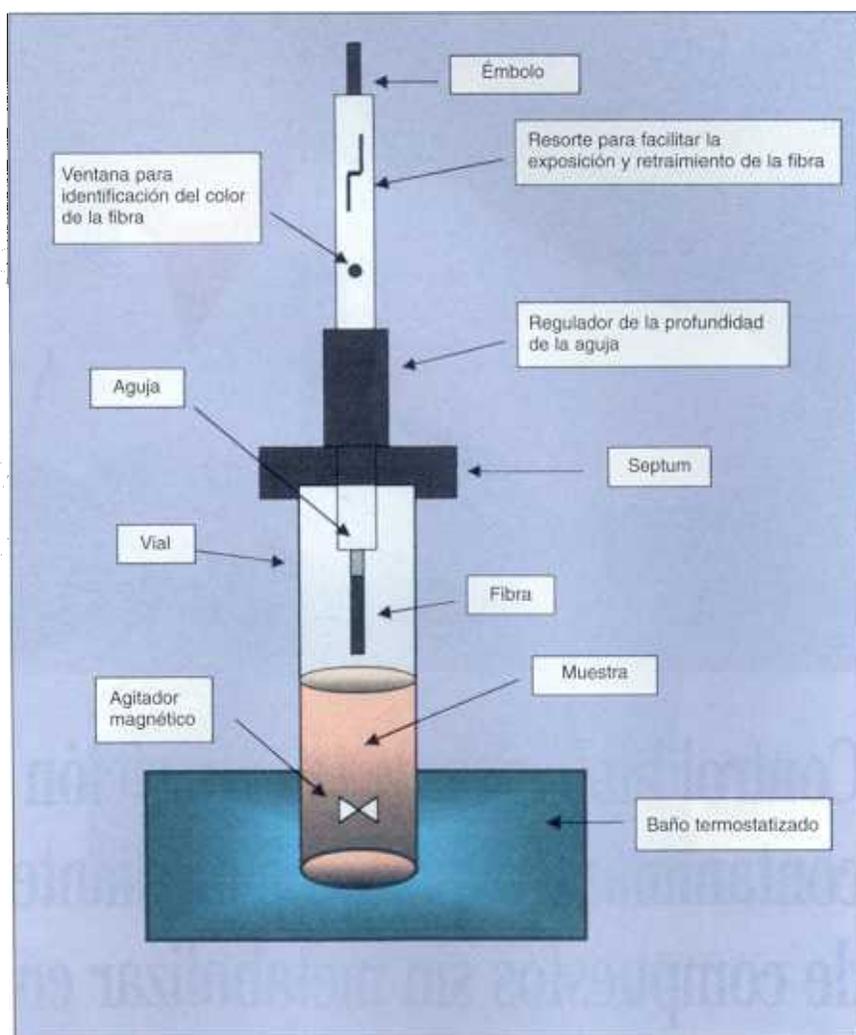
Para el control biológico puede determinarse la concentración de estos compuestos o de sus metabolitos en muestras de aire alveolar, de sangre o de orina.

La utilización de la orina para el control biológico de disolventes orgánicos se ha relacionado normalmente con la determinación de algunos de sus metabolitos excretados: ácidos mandélico y fenilgloxílico para el estireno, fenol para el benceno, 2,5-hexanodiona para el n-hexano, etc. Sin embargo, esta excreción viene afectada por la gran variabilidad interindividual debida a factores tales como la inespecificidad de los metabolitos, interferencias procedentes de la metabolización de otros disolventes, consumo de drogas y alcohol, diferencias en el metabolismo de cada individuo, etc. Recientemente, se está especulando que el compuesto sin metabolizar en orina podría ser un candidato prometedor para el control biológico (Guittori *et al.*, 1987; Kawai *et al.*, 1992, 1996; Mizunuma *et al.*, 1995). Esta opción evita algunos de los problemas mencionados anteriormente relacionados con el metabolismo, pero tiene la desventaja de que las concentraciones que se esperan de los compuestos en orina son muy bajas.

La primera técnica utilizada para aislar los compuestos volátiles de la orina fue la extracción con disolventes (Angerer y Horch, 1992) pero esta técnica presenta inconvenientes, siendo el más importante la evaporación del disolvente, que en muchos casos va acompañada del compuesto de interés. Se han desarrollado también otros métodos basados en el análisis cromatográfico directo de la orina mediante la técnica de head space, donde se inyecta una alícuota de la fase gaseosa que está en equilibrio con un determinado volumen de orina contenido en un vial herméticamente cerrado (Guittori *et al.*, 1987; Gobba *et al.*, 1993; Kok y Ong, 1994). Asimismo, se han desarrollado métodos de «purga y trampa» que están basados en el arrastre, con un gas inerte, de los volátiles presentes en un determinado volumen de orina para su concentración en un tubo relleno con un adsorbente sólido apropiado. Posteriormente, el analito se desorbe térmicamente en su totalidad para su análisis cromatográfico (Periago *et al.*, 1996).

La microextracción en fase sólida es un método que se ha desarrollado recientemente para el análisis de contaminantes ambientales. En los primeros trabajos se demostró que era una

FIGURA 1. Esquema de la unidad de microextracción en fase sólida.



técnica sencilla, rápida y eficaz para el análisis de compuestos aromáticos en agua (Zhang y Pawliszyn, 1993), pero últimamente se están ampliando sus aplicaciones al análisis de contaminantes en otras matrices tales como suelos o fluidos biológicos (Thomas *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). Esta técnica utiliza una fibra de sílice fundida impregnada con una fase estacionaria para extraer los compuestos orgánicos de muestras líquidas. La fibra puede usarse sumergiéndola directamente en el líquido o bien exponiéndola a la fase gaseosa. Una vez que el compuesto está adsorbido en la fibra, se procede a la desorción térmica en el inyector del cromatógrafo y a su análisis.

Esta técnica parece, pues, muy útil, por su economía y sencillez, para el control biológico de contaminantes ambientales y laborales.

El objeto de este trabajo es, por tanto, el estudio de la aplicación de la microextracción en fase sólida al control biológico de compuestos orgánicos

sin metabolizar en orina. Este estudio se ha centrado, en primer lugar, en el desarrollo de un método, optimizando las condiciones de extracción, para la determinación de estireno, lo que permitirá su comparación con el método de purga y trampa (Periago *et al.*, 1996).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sistema de microextracción en fase sólida

La unidad de SPME utilizada (Supelco, Bellefonte, PA), cuyo esquema puede verse en la figura 1, consta de una fibra de un centímetro de largo de sílice fundida recubierta de una fase estacionaria de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor. La fibra, que es retráctil y se encuentra en el interior de una aguja mientras no se está usando, está unida a un émbolo de acero inoxidable que permanece en el interior de un

mango de protección. Antes de su uso es necesario acondicionarla en el portal de inyección del cromatógrafo de gases a 250° C durante una hora para eliminar los contaminantes adsorbidos.

La muestra, 2,5 ml de orina, se coloca en un vial con un agitador magnético en su interior y se cierra rápidamente con un tapón que lleva un septum de silicona. Los viales se mantienen a temperatura constante en un baño termostatzado con agitación (Fig. 2). Transcurrido el tiempo necesario se inserta la aguja, con la fibra retraída, a través del séptum y se oprime el émbolo para exponer la fibra al espacio de cabeza. Después de la adsorción, se introduce la fibra dentro de la aguja y se extrae ésta del vial, llevándola inmediatamente después al portal de inyección del cromatógrafo para su desorción y análisis (Fig. 3).

**FIGURA 2. Exposición de la fibra a la muestra en el baño termostatzado con agitación.**



#### Preparación de disoluciones patrón para calibración

Como patrones para la obtención de la curva de calibrado se utilizan disoluciones de orina con concentraciones conocidas de estireno. Para ello, se preparó una disolución patrón de estireno disolviendo 20µl de estireno en 5 ml de metanol y se completó hasta 10 ml con orina, 1 ml de esta disolución se diluyó posteriormente hasta 100 ml con orina (diso-

**FIGURA 3. Exposición de la fibra al portal de inyección para su desorción.**



lución A). La disolución B se obtuvo a partir de A utilizando un factor de dilución 10. Finalmente, las disoluciones de trabajo se obtuvieron añadiendo diferentes cantidades de las disoluciones A y B a viales y añadiendo orina hasta completar un volumen de 2,5 ml.

La orina utilizada para la preparación de estas disoluciones se obtuvo de individuos sanos sin exposición a estireno.

#### Análisis mediante cromatografía de gases

Para la determinación de estireno se ha utilizado un cromatógrafo de ga-

ses Hewlett-Packard 5890A, equipado con un inyector *split-splitless*, un detector de ionización de llama y una columna capilar HP PONA (*crosslinked Methyl Silicone gum*, 50m x 0,2 mm de diámetro interno y 0,5 µm de espesor de fase).

La fibra se insertó en el inyector del cromatógrafo (Fig. 4) durante dos minutos a 200° C para desorber los contaminantes retenidos. Se probaron tiempos de tres y cinco minutos pero no se encontraron diferencias entre las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas. Un tiempo de desorción de dos minutos parece, pues, suficiente para una desorción completa del estireno, lo que se comprobó, ade-

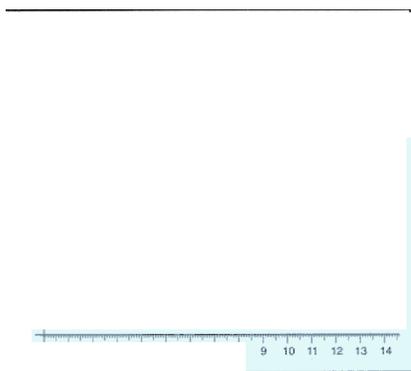
**FIGURA 4. Desorción de la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases.**



más, realizando una segunda desorción de la fibra.

La temperatura de la columna se mantuvo durante tres minutos a 35° C y se aumento a 25° C/min hasta 200° C. La temperatura del detector fue de 250° C y el flujo de gas portador, helio, fue de 0,80 ml/min. La inyección se realizó en el modo sin división de flujo. En la figura 5 puede verse un cromatograma correspondiente a una muestra de orina, donde se observa que el tiempo de retención del estireno en las condiciones descritas es de 13,1 min.

**FIGURA 5. Cromatograma correspondiente a una muestra de orina (estireno, tiempo de retención 13,1 min.).**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la utilización de la técnica SPME influyen distintas variables, tales como modo de extracción, volumen de muestra, tiempo de equilibrio, temperatura y tiempo durante el cual se expone la fibra a la muestra y las condiciones de desorción. Es, por tanto necesario realizar un estudio de la influencia de estas variables con el fin

de seleccionar las condiciones más adecuadas para la determinación de cada contaminante.

Para la extracción del compuesto de interés puede utilizarse tanto la toma de muestra directa por inmersión de la fibra en la muestra como la exposición de la fibra al espacio de cabeza. La elección de uno u otro sistema dependerá de la matriz y del analito que se considere. En general, para compuestos apolares, el equilibrio se suele alcanzar más rápidamente en el espacio de cabeza; además, la vida media de la fibra mejora con respecto a la inmersión. Por estas razones se ha seleccionado en el caso del estireno el espacio de cabeza.

La utilización de volúmenes de muestra grandes permitiría obtener una mayor sensibilidad, ya que la cantidad de estireno en la fase gaseosa sería mayor. Sin embargo, resulta conveniente desarrollar métodos que requieran pequeñas cantidades de muestra; de hecho, en ocasiones resulta difícil obtener muestras de orina abundantes de los trabajadores expuestos. Por ello, se ha seleccionado un volumen total de muestra de 2,5 ml. Este volumen de muestra, en viales de 4 ml, deja un volumen para el espacio de cabeza adecuado para la exposición de la fibra en su totalidad, sin llegar a sumergirse en el líquido.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en el estudio del tiempo de incubación que es el tiempo durante el cual se deja la muestra en el baño a temperatura constante. Puede observarse que un minuto es suficiente y que dejar la muestra durante más tiempo no mejora la extracción de estireno.

Los compuestos orgánicos sin metabolizar pueden extraerse de los especímenes biológicos aumentando la temperatura, normalmente por encima de 60° C. Por otra parte, ya que la ad-

**TABLA 1. Efecto del tiempo de incubación en la extracción de estireno.**

Tiempo (min)	Área registrada
5	2663
2	3162
1	3930

sorción es un proceso exotérmico, la extracción con SPME disminuirá con el aumento de la temperatura. Las temperaturas más comunes, cuando se trabaja en espacio de cabeza, son de 60 a 90° C (Kok y Ong, 1994; Angerer y Horch, 1992); por este motivo se probaron inicialmente temperaturas altas -40, 60 y 80° C-; sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy bajos. En la figura 6 puede verse el efecto de temperaturas más bajas sobre la extracción de estireno, observándose cómo disminuye también el área de los picos de estireno obtenidos con el aumento de la temperatura. Parece, por tanto, que 20° C es la temperatura óptima de trabajo.

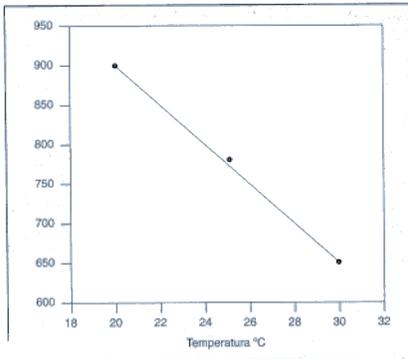
Las condiciones encontradas -un minuto de tiempo de incubación, 20° C y dos minutos de extracción- se utilizaron para todos los análisis posteriores.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del estudio de repetitividad realizados preparando orinas adicionadas con diferentes concentraciones de estireno. En todos los casos se prepararon seis viales, que se encapsularon rápidamente, y a partir de cada uno se obtuvieron los 2,5 ml necesarios para cada análisis; de este modo se consigue que las muestras sean homogéneas para este estudio. El coeficiente de variación obtenido (6,1por ciento) es similar a los resultados obtenidos en la bibliografía (Periago *et al.*, 1996;

**TABLA 2. Repetitividad de la determinación de estireno en orina.**

Concentración (ppm).	Área	R.S.D. (%)	Concentración (ppm).	Área	R.S.D. (%)
0,3522	3760	6,06	0,0710	556,34	6,14
	3584			523,58	
	3439			506,81	
	3239			605,11	
	3232			547,29	
	3341			539,87	
0,2131	1751	2,07	0,0357	327,34	3,01
	1745			327,10	
	1740			333,23	
	1688			316,98	
	1664			342,95	
	1701			342,34	

**FIGURA 6. Influencia de la temperatura del baño en la extracción de estireno.**



Lord y Pawliszyn, 1997; Lee *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 1997).

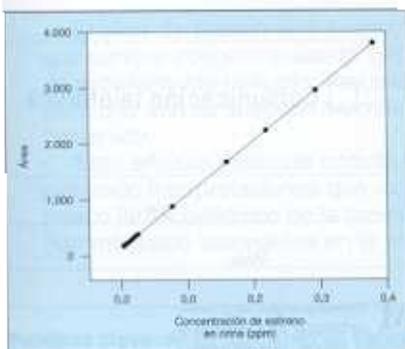
En la figura 7 se muestra la curva de calibración del estireno en orina, que, como puede observarse, presenta una buena correlación lineal en el rango de concentraciones estudiado. Los parámetros de la recta son los siguientes:

$$Y = -7.96 + 10153.1 X; r = 0.9997$$

(Y = área; X = ppm de estireno). El límite de detección obtenido es de  $2.18 \cdot 10^{-3}$  ppm.

Este límite de detección, obtenido en las condiciones experimentales descritas, aunque es superior al encontrado usando la técnica de purga y trampa (Periago *et al.*, 1996), permite determinar los niveles habituales esperados en trabajadores expuestos a estireno. Por otro lado, la técnica SPME presenta la ventaja de no necesitar pretratamiento de la muestra, lo que disminuye el tiempo de análisis y, además, necesita menos volumen de orina para la realización de cada análisis.

**FIGURA 7. Curva de calibración para el estireno en orina. Condiciones de extracción: 2,5 ml de orina adicionada, un minuto a 20° C de incubación y dos minutos a 20° C de extracción.**



## CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto un método de determinación de estireno en orina utilizando microextracción en fase sólida, que puede ser muy útil en el control biológico de compuestos orgánicos en orina. La extracción de estireno a partir de orinas adicionadas es repetitiva, y la curva de calibración muestra una buena correlación lineal. El método presentado aquí tiene la ventaja de ser sencillo, rápido y de no requerir pretratamiento de la muestra, con lo que resulta una herramienta muy útil para el control biológico.

Este método es aplicable a la determinación de otros compuestos orgánicos volátiles en fluidos biológicos. En cada caso deberán seleccionarse las condiciones más adecuadas para la determinación de cada contaminante.

*El control ambiental de la exposición laboral a contaminantes orgánicos está basado en la estimación de la dosis externa a partir de la evaluación de los niveles de concentración en aire de los mismos. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado procedimientos de control biológico que permiten estimar la dosis interna mediante la evaluación de indicadores específicos en diferentes fluidos biológicos.*

## BIBLIOGRAFÍA

Angerer, J., y Horsch, B. (1992): «Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine», *J. Chromatogr.*, vol. 580, pp. 229-255.

Ghittori, S.; Imbriani, M., Pezzagno, G., y Capodaglio E. (1987). «The urinary concentrations of solvents as a biological indicator of exposure: proposal for the biological equivalent exposure limit for nine solvents», *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, vol.48, pp.786-790.

Gobba, F.; Galassi, C.; Ghittori, S.; Imbriani, M.; Pugliese, F., y Cavalleri, A. (1993): «Urinary styrene in the biological monitoring of styrene exposure» *Scand. J. Work Environ. Health.*, núm 19, pp.175-182.

Kawai, T.; Yasugi, T.; Mizunuma, K.; Horiguchi, S.; Iguchi, H.; Uchida, Y.; Iwami, O., y Ikeda, M. (1992): «Comparative evaluation of urinalysis and blood analysis as means of detecting exposure to organic solvents at low concentrations», *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, vol. 64, pp. 223-234.

Kawai, T.; Mizunuma, K.; Okada, Y.; Horiguchi, S., y Ikeda, M. (1996): «Toluene itself as the best urinary marker of toluene exposure», *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, núm. 68, pp. 289-297.

Kok, P.W., y Ong, C.N. (1994): «Blood and urinary benzene determined by headspace gas chromatography with photoionization detection: application in biological monitoring of low-level nonoccupational exposure», *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, núm. 66, pp. 195-201.

Lee, X.-P.; Kumazawa, T.; Sato, K., y Suzuki, O. (1997): «Detection of tricyclic antidepressants in whole blood by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography», *J. Chromatogr. Sci.*, vol 35, pp. 302-308.

Lord, H. L., y Pawliszyn J. (1997). «Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction», *Anal. Chem.* vol. 69, pp. 3899-3906.

Mizunuma, K.; Kawai, T.; Horiguchi, S., e Ikeda, M. (1995): «Urinary methylchloroform rather than urinary metabolites as an indicator of occupational exposure to methylchloroform», *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, vol. 67, pp. 19-25.

Nishikawa, M.; Seno H.; Ishii, A.; Suzuki, O.; Kumazawa, T. Watanabe, K., y Hattori, H. (1997). «Simple analysis of diphenylmethane antihistaminics and their analogues in bodily fluids by headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography», *J. Chromatogr. Sci.*, Vol 35, pp. 275-279.

Periago, J. F.; Prado, C. y Luna, A. (1996): «Aplicación de la desorción térmica al control biológico de estireno en aire exhalado y orina», MAPFRE SEGURIDAD, núm. 63, pp.3-13

-: «Purge and trap method for the determination of styrene in urine», *J. Chromatog. A.*, núm 719, pp.53-58.

Thomas, S. P.; Ranjan, R. S.; Webster G.R.B., y Sama, L. (1996): «Protocol for the analysis of high concentrations of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers in water using automated solid-phase microextraction-GC-FID», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 1521-1526.

Zhang, Z., y Pawliszyn, J. (1993): «Headspace solid-phase microextraction», *Anal. Chem.*, 65, 1843-1852.