

CONTROL DEL RIESGO DE LOS TRABAJADORES DEL CALZADO EXPUESTOS A n-HEXANO

A. Cardona / D. Marhuenda / J. Martí / J. Roel* / T. Quintanilla* / J.M. Sánchez*
Departamento de Salud Comunitaria. División de Medicina Legal y Toxicología.
Facultad de Medicina. Universidad de Alicante.

*Gabinete de Higiene y Seguridad en el Trabajo de Alicante.

INTRODUCCION

El n-hexano se usa habitualmente como disolvente de pinturas, barnices y colas, siendo conocida su toxicidad desde que en 1967 Yamada describió la aparición de polineuritis en trabajadores expuestos a este disolvente.

Este efecto neurotóxico se atribuye al metabolito 2,5 hexanodiona (2,5-HD) que, como han descrito Krasavage y col. (1980), Abou-Donia y col. (1982) y De Caprio y col. (1985, 1987, 1988) presumiblemente forma grupos pirroles con las proteínas axónicas. Además es el metabolito mayoritario en el hombre, como demostraron Perbellini y col. en 1981 (b). Por todo lo cual, su determinación resulta el mejor índice para valorar individualmente el nivel de exposición al n-hexano.

Sin embargo, a diferencia de otros disolventes, la experiencia en el control biológico del n-hexano es escasa y siempre se ha realizado con un escaso número de expuestos. Para una síntesis de las mismas se recomienda la amplia revisión bibliográfica de De Rosa y col. (1988).

El objetivo de este trabajo es el de presentar los resultados obtenidos en el ámbito de la situación de riesgo a la exposición de disolventes en la industria del calzado de Alicante. En particular, hemos analizado la relación existente entre el nivel de exposición a n-hexano y la excreción urinaria de 2,5-HD, así como algunos aspectos farmacocinéticos de este metabolito.

MATERIAL Y METODOS

Muestra

Han sido objeto de nuestro estudio 118 trabajadores de la industria del calzado alicantina, correspondientes a 22 empresas distintas, que están expuestos a colas conteniendo n-hexano.

A todos ellos se les ha pasado una encuesta epidemiológica, con el fin de valorar los principales aspectos higiénico-laborales y médico-clínicos relacionados con el objetivo de nuestro trabajo, se les medía la concentración de disol-

ventes en su puesto de trabajo y se les recogía una dosis de orina al final de su turno laboral.

Control ambiental

La valoración de la concentración ambiental de disolventes ha sido efectuada mediante monitores personales activos, utilizando tubos de carbón activo y bomba de flujo constante Sipin (flujo de aspiración 0,2 l/min.). Los tubos de carbón activo eran cambiados cada 50 minutos para evitar posibles fenómenos de saturación del carbono y distribuidos a lo largo de la jornada laboral.

La determinación de los disolventes absorbidos se ha llevado a cabo siguiendo el método recomendado por el NIOSH (1977) desabsorbiendo el carbono con disulfuro de carbono y realizando la cuantificación en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8310, con columna empacada con Carbopack C conteniendo 0,1 % SP 1000 y con detector de ionización de llama.

El límite de detección es de 3 mg/m³.

Control biológico

La determinación de las 2,5-HD se ha realizado tomando como base el método de Perbellini y col. (1981) con las modificaciones descritas por Fedtke y col. (1986) y que describimos a continuación:

Como estándar interno se utiliza la ciclohexanona y las condiciones operativas de los instrumentos que hemos utilizado (cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890, equipado con una columna empacada con Carbopack C-80-100/Carbowax 0,2 % 1500 y detector de ionización de llama) son las siguientes: temperatura del bloque de inyección 225 °C, temperatura del detector 225 °C, temperatura inicial del horno 120 °C durante 6 minutos, temperatura final del horno 145 °C durante 5 minutos, gradiente de temperatura del horno 2 °C/min., caudal de gas portador (nitrógeno) 20 ml/min.

El límite de detección es de 0,1 mg/l.



Extracción de la muestra

Se realiza mediante una minicolumna rellena con una fase de octadecil-sileno (Sep-Pack C18; Waters), previa hidrólisis ácida, según el siguiente protocolo:

1. Se acidifica 1 ml de la muestra de orina con HCl 3,6M hasta un ph de 0,1 y se calienta en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se neutraliza a ph 7 con NaOH 3M.

2. Se pasa la muestra por la minicolumna, previamente acondicionada con 5 ml de metanol y 30 ml de agua destilada. Los componentes de alta polaridad se eluyen con 2 ml de agua destilada y los de polaridad intermedia, entre los que se encuentran los metabolitos del n-hexano, con 1 ml de diclorometano. A este eluato se incorporan 100 µl de la solución en diclorometano del estándar interno, para que resulte a una concentración final de 32 mg/l y se inyectan 2 µl en el cromatógrafo.

Preparación de los patrones

La solución estándar para el cálculo del Factor de Respuesta contiene 32 mg/l de 2,5-HD y del estándar interno ciclohexanona, disueltos en diclorometano.

Los distintos patrones para los cálculos del porcentaje de recuperación del método de extracción y de las curvas de elución y de calibrado, se obtienen de alícuotas de 1 ml de orina, a los que se añaden «in vitro» concentraciones conocidas de 2,5-HD, que se someten al proceso de extracción descrito anteriormente para las muestras.

Porcentaje de recuperación del método de extracción

La *tabla 1* muestra los porcentajes de recuperación en orina para la 2,5-HD, tras la extracción con las minicolumnas Sep-Pak C18, de tres patrones a concentraciones conocidas: 0,5, 5 y 50 mg/l.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{cantidad encontrada}}{\text{cantidad añadida}} \times 100$$

TABLA 1

Porcentaje de recuperación de la 2,5-HD en orina

Concentración estándar (mg/l)	Concentración recuperada (mg/l)	% recuperación
0,5	0,43	86,30
5,0	4,63	92,59
50,0	46,24	92,48
Media		90,50
Desviación estándar		2,94

Curva de elución

Para validar el método y determinar si con el ml de diclorometano que sirve de eluyente en la extracción es suficiente para obtener el mayor porcentaje de metabolitos, se ha realizado una curva de elución con un patrón en orina de 50 mg/l de 2,5-HD, pero eluyendo en esta ocasión con 3 ml de diclorometano, que recogemos por separado.

La recuperación en el primer ml fue del 92,48 %, resultando indetectable en los dos siguientes ml.

Cuantificación

La cuantificación del metabolito se realiza determinando la relación de áreas entre el metabolito en estudio y el estándar interno. Esta razón se traslada a una recta de calibrado, previamente calculada con concentraciones decrecientes entre 200 y 0,5 mg/l de 2,5-HD en orina, cuyos valores vienen corregidos con la pérdida ocasionada en el proceso de extracción.

Para corregir el error de una posible falta de reproducibilidad por fallos del operador, se comprueba esta recta de calibrado diariamente, mediante la inyección de una solución estándar que sirve como Factor de Respuesta en caso de variación.

La concentración urinaria encontrada de 2,5-HD es posteriormente corregida respecto a una densidad de 1.024.

RESULTADOS

Niveles de exposición a n-hexano y de excreción de 2,5-HD

Los resultados relativos a los niveles de exposición a n-hexano y a la excreción urinaria de 2,5-HD de los trabajadores controlados vienen recogidos en la *tabla 2*.

TABLA 2

Parámetros estadísticos obtenidos de los valores de exposición a n-hexano y de la concentración urinaria de 2,5-HD en los 118 trabajadores controlados

	n-hexano (mg/m ³)	2,5-HD (mg/l)
Rango	1-708,7	0,2-24,2
Media	147,5	7,5
Desviación estándar	150,5	5,0
Mediana	104,7	7,3

Como se observa la exposición está comprendida en un amplio rango con una mediana 104,7 mg/m³. Paralelamente la excreción urinaria de 2,5-HD varía de 0,2 a 24,2 mg/l con una mediana de 7,3 mg/l.

Correlación n-hexano - 2,5-HD

La distribución asimétrica de las concentraciones del disolvente y de su metabolito hacen necesario, con el fin de valorar el grado de asociación entre ambas variables, recurrir a un test no paramétrico como es el coeficiente de correlación para rangos de Spearman, resultando un valor de 0,8439 con una significación estadística de $p < 0,001$.

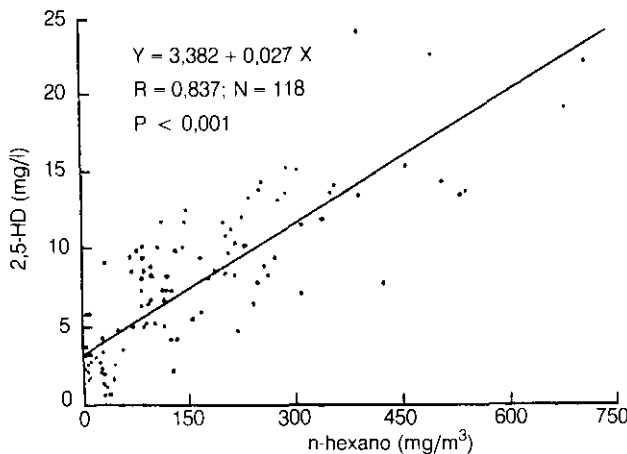


Fig. 1. Correlación entre las concentraciones ambientales medias de n-hexano y las concentraciones de 2,5-hexanodiona en la orina recogida al término del turno de trabajo.

En la figura 1 se representa la recta de regresión calculada utilizando los datos de la concentración media ambiental de n-hexano que presenta cada trabajador en su puesto de trabajo y la concentración de 2,5-HD encontrada en la orina recogida al finalizar la jornada laboral de todos los operarios cuya exposición ha sido monitorizada.

Como se observa en la figura 1, existe una correlación lineal estadísticamente significativa entre los dos parámetros. Los límites de confianza sugieren que para una exposición media de 180 mg/m³ (TLV propuesto por la ACGIH para 1988-1989) corresponden concentraciones urinarias de 2,5-HD comprendidas entre 7,5 y 8,5 mg/l.

Relación con los días de la semana

En la figura 2 viene representada la media y la desviación estándar de la relación entre la concentración de 2,5-HD encontrada en la orina recogida al término del turno de trabajo y la exposición media a n-hexano (tal cociente ha sido multiplicado por 100 a fin de obtener valores normali-

zados para exposición de 100 mg/m³). Los datos son subdivididos en relación a los días de la semana en que han sido efectuadas las determinaciones ambientales y las correspondientes recogidas de la orina. Para este estudio hemos eliminado 19 casos en los que la concentración me-

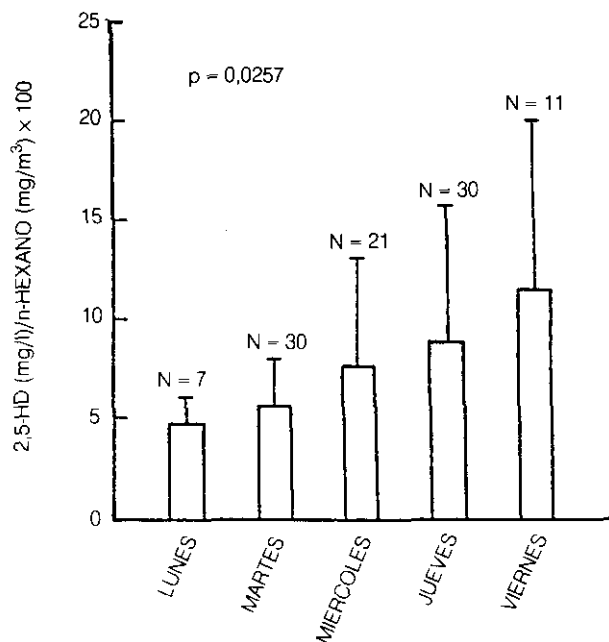


Fig. 2. Concentraciones urinarias de 2,5-hexanodiona en relación a las exposiciones medias de n-hexano, en los distintos días de la semana (los resultados han sido multiplicados por 100 para normalizarlos a la exposición de 100 mg/m³).

dia de n-hexano era igual o inferior a 3 mg/m³, por no poder precisar bien en ese rango los valores exactos.

Conforme avanza la semana la concentración urinaria de 2,5-HD tiende a incrementar constantemente. A igualdad de exposición a n-hexano, la 2,5-HD hallada en la orina recogida el viernes por la tarde presenta concentraciones medias que son 2,3 veces superiores a las encontradas el lunes al término del turno de trabajo. El análisis de la varianza de estos valores resulta significativo con una $p = 0,0257$.

Relación de la 2,5-HD con otros factores

Ante la posibilidad de interferencias por otras variables en la síntesis o la excreción de la 2,5-HD, hemos correlacionado los resultados obtenidos en la encuesta epidemiológica pasada a los trabajadores, así como las concentraciones obtenidas de otros disolventes presentes en el ambiente del puesto de trabajo, con la excreción urinaria de 2,5-HD, no encontrando ninguna relación significativa. En la tabla 3 se recoge una síntesis de los parámetros estadísticos recogidos en la encuesta epidemiológica y en la tabla 4 de las concentraciones ambientales de los distintos disolventes.



TABLA 3

Parámetros estadísticos obtenidos del paso de una encuesta epidemiológica a los 118 trabajadores controlados

	Media	Desviación estándar	Rango
Alcohol habitual	49,1 %		
Fumador en el trabajo	47,5 %		
Sexo (hombres)	72,9 %		
Edad (años)	25,3	10,7	16-59
Horas de trabajo semanal	42,7	10,9	40-55
Meses en el trabajo	8,3	23,3	1-248

TABLA 4

Concentraciones ambientales de los disolventes obtenidos en los 118 trabajadores controlados. Los valores están expresados en mg/m³.

	Media	Desviación estándar	Rango
n-hexano	147,5	150,5	1-708,7
Tolueno	151,7	123,8	0-570
MEK	37,7	108,9	0-905
Isómeros hexano	166,0	159,7	0-879
Acetona	274,0	474,3	0-2238
Acetato de etilo	16,9	46,3	0-440
Heptano	58,2	224,7	0-2365
Diclorometano	42,4	94,5	0-609,5
M. C. pentano	1,8	8,9	0-75
Tricloroetileno	10,0	43,7	0-421
Mi B K	0,6	5,6	0-59
Alcohol isopropílico	0,5	3,1	0-24
Xileno	0,1	0,6	0-7
Alcohol isobutilico	0,1	0,6	0-7
Octano	0,7	5,1	0-43
M. C. hexano	0,2	1,7	0-14

Leyenda: MEK = metil-etil-cetona; M. C. pentano = metil-ciclo-pentano; Mi B K = metil-isobutil-cetona; M. C. hexano = metil-ciclo-hexano

DISCUSION

Los datos recogidos en este trabajo (figura 1) confirman la correlación entre la exposición a n-hexano y la excreción urinaria de 2,5-HD y amplían notablemente las casuísticas analizadas.

En la muestra estudiada el valor medio de la concentración ambiental de n-hexano es de 147,5 mg/m³ con una mediana de 104,7, lo que resulta inferior al TLV propuesto por la ACGIH para 1988-1989 (180 mg/m³).

Por contra, el BEI que nos resulta en relación al valor del TLV (8 ± 0,5 mg/l) es superior al descrito por otros autores como Perbellini y col. (1981b, 1982b, 1985a, 1985b), Iwata y col. (1983), De Rosa y col. (1988) y que ha sido propuesto por la ACGIH en 5 mg/l.

Al menos son tres las circunstancias que pueden explicar este valor superior del BEI. En primer lugar, que en nuestra casuística el 72,9 % son varones, en contra del resto de estudios en que la muestra es mayoritariamente de hembras, las cuales poseen una menor capacidad de ventilación pulmonar. Segundo, la media en horas de trabajo semanal en nuestro estudio es de 42,7; siendo la de los otros autores igual o inferior al 39. Y, finalmente, el hecho de que la composición de las colas posiblemente sea distinta, lo que podría modificar la cinética de los metabolitos del n-hexano.

Cuando se estudia la razón 2,5-HD/n-hexano en relación al día de la semana en el que se realiza la recogida de la orina (figura 2), se observa que los turnos de trabajo cotidianos implican una tendencia al acúmulo en el organismo de la 2,5-HD, que (a igualdad de exposición media a n-hexano) presenta concentraciones en orina progresivamente crecientes. Este hecho ya había sido descrito por Perbellini y col. (1985a) y Ahonen y col. (1988) con una menor casuística y sin recoger todos los días de la semana.

No se ha encontrado significación estadística entre el tiempo que lleva un operario en el trabajo y la concentración de 2,5-HD. De ello podemos deducir que a los niveles del metabolito encontrados, parece que es suficiente el descanso de dos días a la semana para impedir el progresivo acúmulo de la 2,5-HD en el organismo.

Se han descrito algunas interferencias metabólicas y/o toxicológicas entre el n-hexano y otros disolventes presentes en el aire ambiental del puesto de trabajo. Así, Coupi (1977) ha señalado que la MEK actúa como inductor enzimático y Altenkirch y col. (1982) y Takeuchi y col. (1983) que potencia la neurotoxicidad del n-hexano, habiéndose encontrado por Perbellini y col. (1985a) que está relacionada con la excreción de 2,5-HD. Por su parte, el tolueno actúa disminuyendo las concentraciones de 2,5-HD excretadas por la orina como ha descrito Perbellini y col. (1982a) en experimentación animal.

En nuestra casuística ninguno de los disolventes detectados en el ambiente de trabajo (tabla 4) presenta una correlación significativa sobre la excreción urinaria de 2,5-HD en relación con el nivel de exposición a n-hexano.

BIBLIOGRAFIA

1. ABOU-DONIA, M. B.; MAKKAWAY, H. M.; GRAHAM, D. G.: The relative neurotoxicities of n-hexane, methyl n-butyl ketone, 2,5-hexanediol, and 2,5-hexanediones following oral or intraperitoneal administration in hens. Toxicol. Appl. Pharmacol. 62: 369, 1982.

2. AHONEN, I.; SCHIMBERG, R. W.: 2,5-Hexanedione excretion after occupational exposure to n-hexane. *Br. J. Ind. Med.*, 45: 133, 1988.
3. ALTENKIRCH, H.; WAGNER, H. M.; STOLTENBURG, G.; SPENCER, P. S.: Nervous system responses of rats to subchronic inhalation of n-hexane and n-hexane + methyl ethyl ketone mixtures. *J. Neurol. Sci.*, 57: 209, 1982.
4. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: *Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices for 1988-1989*. ACGIH, Cincinnati, OH, 1988.
5. COUPI, D.; HETLAND, L. B.; ABDEL-RAHMAN, M. S.; WEISS, H.: The influence of inhaled ketone solvent vapors on hepatic microsomal biotransformation activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41: 285, 1977.
6. DE CAPRIO, A. P.; O'NEILL, E. A.: Alterations in rat axonal cytoskeletal proteins induced by in vitro and in vivo 2,5-hexanedione exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78: 235, 1985.
7. DE CAPRIO, A. P.: N-hexane neurotoxicity: A mechanism involving pyrrole adduct formation in axonal cytoskeletal protein. *Neurotoxicology*, 8,1: 199, 1987.
8. DE CAPRIO, A. P.; BRIGGS, R. G.; JACOWSKI, S. J.; KIM, J. C. S.: Comparative neurotoxicity and pyrrole-forming potential of 2,5-hexanedione and perdeuterio 2,5-hexanedione in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92: 75, 1988.
9. DE ROSA, E.; BARTOLUCCI, G. B.; PERBELLINI, L.; BRUGNONE, F.; RAUSA, G.: Environmental and biological monitoring of exposure to toluene, styrene, and n-hexane. *Appl. Ind. Hyg.*, 3,12: 332, 1988.
10. FEDTKE, N.; BOLT, H. M.: Methodological investigations on the determination of n-hexane metabolites in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 57: 149, 1986.
11. IWATA, M.; TAKEUCHI, Y.; HISANAGA, N.; ONO, Y.: A study on biological monitoring of n-hexane exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 51: 253, 1983.
12. KRASAVAGE, W. J.; O'DONOGHUE, J. L.; DI VICENZO, G. D.; TERHAAR, C. J.: The relative neurotoxicity of methyl n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 52: 433, 1980.
13. NIOSH: *NIOSH manual of analytical methods*. US Dept. of Health, education and Welfare. Cincinnati OH 2nd edition, vol. 2, 1977.
14. PERBELLINI, L.; BRUGNONE, F.; SILVESTRI, R.; GAF-TURI, E.: Measurement of the urinary metabolites of n-hexane, cyclohexane, and their isomers by gas chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 48: 99, 1981(a).
15. PERBELLINI, L.; BRUGNONE, F.; FAGGIONATO, G.: Urinary excretion of the metabolites of n-hexane and its isomers during occupational exposure. *Brit. J. Ind. Med.*, 38: 20, 1981(b).
16. PERBELLINI, L.; LEONE, R.; FRACASO, M. E.; BRUGNONE, F.; VENTURINI, M. S.: Metabolic interaction between n-hexane and toluene in vivo and in vitro. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 50: 351, 1982(a).
17. PERBELLINI, L.; AMANTINI, M. C.; BRUGNONE, F.; FRONTALI, N.: Urinary excretion of n-hexane metabolites. *Arch. Toxicol.* 50: 203, 1982(b).
18. PERBELLINI, L.; BARTOLUCCI, G. B.; BRUGNONE, F.; DE ROSA, E.; VALENTINI, F.: Il 2,5-esandione nel controllo biologico dell'esposizione professionale a n-esano. *Med. Lav.*, 76,1: 35, 1985(a).
19. PERBELLINI, L.; BRUGNONE, F.; MOZZO, P.; De ROSA, E.; BARTOLUCCI, G.; FACCINI, G.: Toxicokinetic aspects of n-hexane and 2,5-hexanedione in the biomonitoring of occupational exposure to n-hexane. *Ann. Am. Conf. Ind. Hyg.*, 12: 357 1985(b).
20. TAKEUCHI, Y.; ONO, Y.; HISANAGA, N.; IWATA, M.; ADYAMA, M.; KITO, O.; SUGIURA, Y.: An experimental study of the combined effects of n-hexane and methyl ethyl ketone. *Br. J. Ind. Med.* 40: 199, 1983.
21. YAMADA, S.: Intoxication polyneuritis by n-hexane in the workers exposed to n-hexane. *Jpn. J. Ind. Health*, 9: 651 1967.