

# **ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL TOLUENO EN ORINA EN DISTINTOS SISTEMAS DE RECOLECCIÓN**

---

Isabel Alfaro S., Instituto de Seguridad del Trabajo  
Ingrid Arenas V., Instituto de Seguridad del Trabajo  
Karina Saavedra, Universidad Técnico Federico Santa María

**IST**

## RESUMEN

La exposición laboral a tolueno es biomonitorizada determinando su concentración en sangre y orina, siendo esta última la ejecutada en la práctica debido a su fácil muestreo durante la jornada de trabajo y a su recolección no invasiva. En la actualidad, los protocolos de toma de muestras biológicas no indican un contenedor de recolección específico para este compuesto volátil, por lo que en este estudio se realiza la monitorización de tolueno (30 µg/L, n=6) en orina en tres sistemas de recolección distintos almacenados a 4°C y 18°C durante 14 días, con el objetivo de establecer que contenedor permite mantener la estabilidad del tolueno urinario de acuerdo a las variables aplicadas.

Los resultados obtenidos en los tres contenedores no presentan diferencias significativas a 4°C, pero si a 18°C ( $p < 0,0001$ ). El contenedor hermético con tubo al vacío logra mantener mejor la integridad química del tolueno en orina a una temperatura de almacenamiento de 4°C y un tiempo de conservación máximo de 5 días hasta su procesamiento analítico, para la obtención de resultados válidos y representativos en la muestra recolectada.

## INTRODUCCIÓN

El tolueno es un compuesto orgánico volátil (VOC) altamente utilizado como disolvente a nivel industrial, siendo una sustancia con efectos neurotóxicos y hepatotóxicos, por lo que la exposición laboral a este compuesto debe ser biomonitorizada.

En Chile, hasta el año 2015 el monitoreo de exposición biológica de tolueno era realizado determinando ácido hipúrico en orina, sin embargo, estudios toxicocinéticos han concluido que es un indicador biológico inespecífico y de baja sensibilidad producto de las interferencias que afectan la biotransformación del tolueno y a la alta variabilidad genética interindividual (Ducos *et al.*, 2008; Fustinoni *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 1996). Por consiguiente, ese mismo año el Ministerio de Salud de Chile actualizó el Decreto Supremo (D.S.) N° 594, reemplazando a este metabolito por el tolueno no metabolizado en sangre y orina como nuevo biomarcador de exposición a este agente, con límites de tolerancia biológica de 0,05 mg/L y 30 µg/L, respectivamente.

Los compuestos no metabolizados se caracterizan por presentar ventajas frente a los metabolitos excretados en orina, ya que no son afectados por la ruta metabólica exhibiendo una mejor correlación incluso a bajos niveles de exposición ambiental, son más específicos y sensibles permitiendo distinguir a trabajadores expuestos de los no expuestos (Decharat, 2016; Janasik *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 1992). La principal técnica de cualificación y cuantificación de volátiles es mediante Cromatografía de gases con Headspace, debido a su eficiencia en la transferencia de masa a causa de la poca manipulación de la muestra y la sencillez en su preparación. Pese a que el compuesto no metabolizado del tolueno es excretado en menor proporción que sus metabolitos en orina (Jeong *et al.*, 2016), gracias a los avances y mejoramiento de selectividad y sensibilidad de ésta técnica se ha permitido cuantificar a concentraciones del orden de partes por billón (ppb).

Considerando que ambos indicadores son representativos, la toma de muestra de VOC en orina presenta ventajas por ser una técnica no invasiva y de fácil recolección (Janasik *et al.*, 2008). En la práctica, la cuantificación de cualquier analito no es realizada en forma inmediata, por lo tanto, para mantener la estabilidad del tolueno es fundamental controlar las etapas de recolección, manipulación, transporte, almacenamiento hasta su procesamiento analítico con el fin de garantizar resultados válidos y representativos.

En los protocolos de Salud Ocupacional para la toma de muestras biológicas (ISPCH, 2013) se entregan pautas que permiten controlar los procesos de recolección, así como también los de transporte y almacenamiento, pero no se especifican mayores características del tipo de contenedor que permita asegurar la integridad química del analito en la muestra sobre todo de aquellos con naturaleza volátil.

El objetivo de este trabajo es estudiar la estabilidad de tolueno en orina almacenada en distintos sistemas de recolección: contenedor de polipropileno estéril, contenedor de vidrio con sello hermético y contenedor de polipropileno estéril con tubo al vacío, en condiciones de tiempo y temperatura preestablecidas. Para ello se evalúa la estabilidad del tolueno en orina conservando las muestras por un período de 14 días a 4°C y 18°C. El análisis cuantitativo se realiza por sextuplicado monitoreando al analito en las condiciones descritas bajo la técnica de Cromatografía de gases con *Headspace*.




## DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se trabaja con muestras de orina de sujetos no expuestos a tolueno, la cual se utiliza como matriz para la preparación de las muestras, controles y estándares de calibración.

La orina se fortifica con 280  $\mu\text{L}$  de tolueno (Merck, 99,9% de pureza) disueltos en 5 mL de etanol (Merck, 99,9% de pureza) para favorecer su solubilidad en la matriz y así obtener una concentración final de 30  $\mu\text{g/L}$  de tolueno. Cada contenedor es llenado con la solución fortificada de orina en un 85% de su capacidad en el menor tiempo posible para minimizar la pérdida del solvente por efecto de volatilidad en el espacio libre (Gill *et al.*, 1988).

Los 3 tipos de contenedores (ver Tabla 1) son almacenados a 4°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) y 18°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por un periodo de 14 días, simulando condiciones de transporte y almacenamiento para comprobar la eficiencia del recipiente y la estabilidad del analito en la matriz hasta su análisis.

**Tabla 1. Tipos de contenedores y sus características.** Se describen las características del contenedor A, B y C.

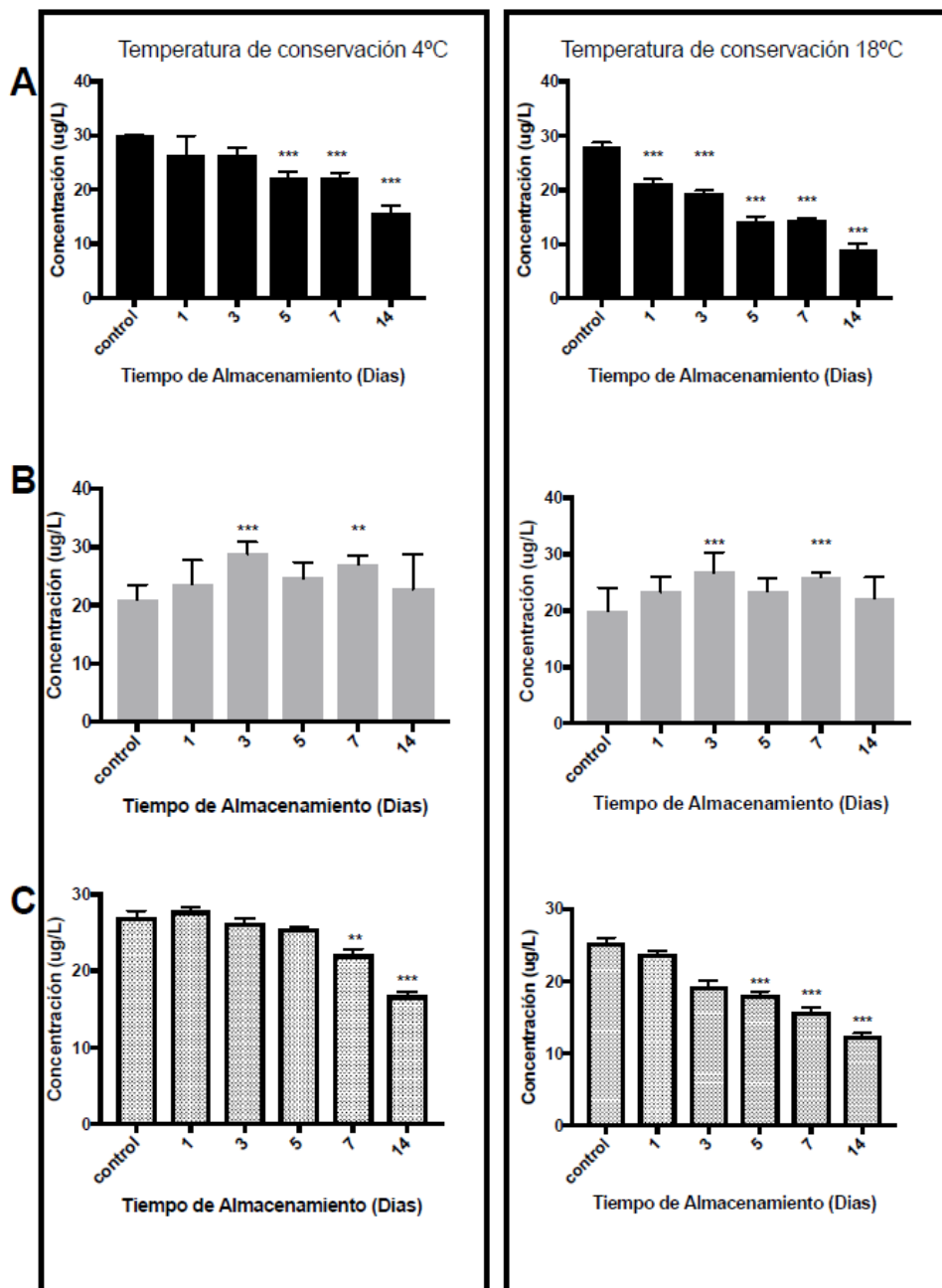
Tipo de Contenedor	Características	Representación
<b>A</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Contenedor de polipropileno estéril de 120 mL.</li><li>- Utilizado comúnmente en recolección de orina.</li></ul>	
<b>B</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Contenedor polipropileno estéril de 60 mL con boquilla para llenar frasco de vidrio con tapa de aluminio hermética de 20 mL.</li><li>- Recomendado en norma NIOSH 8319 para toma de muestras de acetona y metil etil cetona en orina.</li></ul>	
<b>C</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Contenedor estéril de polipropileno de 120 mL, con cánula y aguja interior para utilizar con tubos de vacío de 9 mL (tapón hermético).</li><li>- Material compatible con toma de muestra a tolueno por su resistencia química.</li></ul>	

La cuantificación es realizada por el procedimiento de estándar externo mediante Cromatografía de gases con *Headspace*, utilizando una columna de 6% cianopropilfenil-dimetilpolisiloxano (75 m x 0,53 mm x 3,00 µm). Se preparan estándares de tolueno para la elaboración de la curva de calibrado en un rango lineal de 5 a 60 µg/L en orina. La concentración de tolueno se determinó por medio de la interpolación del área (mV) detectada del analito en la curva de calibrado versus concentración (µg/L). La metodología se valida de acuerdo a los parámetros de linealidad, sensibilidad (límite de detección y cuantificación), precisión (repetibilidad), especificidad y exactitud.

### **Análisis Estadístico**

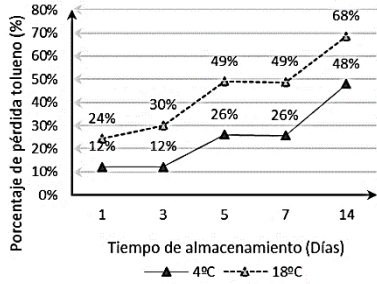
Las diferencias de concentración de tolueno en los distintos contenedores son evaluadas estadísticamente aplicando análisis de Kruskal-Wallis y Dunnett ( $p < 0,05$ ) utilizando el programa estadístico Stata v. 15.0.

## RESULTADOS

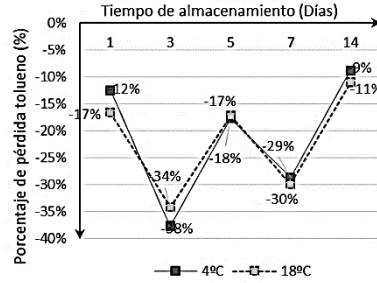


**Gráfico 1. Variabilidad de la concentración de tolueno en orina en 3 sistemas de recolección por un periodo de 14 días a 4°C y 18°C. A. Contenedor de polipropileno estéril B. Contenedor de vidrio con tapa rosca C. Contenedor de polipropileno con tubo a vacío. Diferencias significativas obtenidas comparando los resultados de los días analizados 1, 3, 5, 7 y 14 (n=6) con día control. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001**

Contenedor A



Contenedor B



Contenedor C

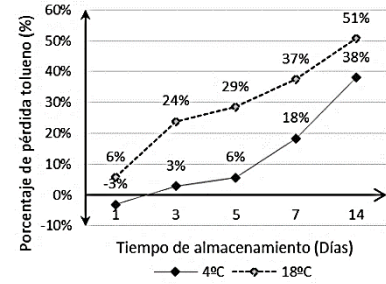


Gráfico 2. Porcentaje de pérdida de la concentración de tolueno en orina (30 µg/L) por un periodo de 14 días a 4°C y 18°C en los contenedores A, B y C.

Tabla 2. Análisis estadístico de comparación de la concentración entre los tres sistemas de recolección a 4° y 18°C. Test Kruskal-Wallis y Test Dunnet.

Contenedor	Probabilidad (p<0,05, n= 36)	
	4°C	18°C
A	p = 0,2242	p < 0,0001 (A v/s B / B v/s C)
B		
C		

Tabla 3. Análisis estadístico de comparación de la concentración en un mismo contenedor por un periodo de 14 días a temperatura de 4°C y 18°C. Test Kruskal-Wallis.

Día de almacenamiento	Valor p Temperatura de almacenamiento de 4°C			Valor p Temperatura de almacenamiento de 18°C		
	A	B	C	A	B	C
1	0,0771	0,1194	0,1038	0,0001	0,0695	0,162
3	0,0853	0,0001	0,3109	0,0001	0,0001	0,0243
5	0,001	0,0897	0,1140	0,0001	0,0625	0,001
7	0,001	0,001	0,001	0,0001	0,0001	0,0001
14	0,0001	0,1489	0,0001	0,0001	0,1829	0,00001



## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 2, los tres contenedores no presentan diferencias significativas en la concentración de tolueno detectada cuando la muestra es conservada a 4°C, en cambio a 18°C se obtienen diferencias significativas entre los contenedores A versus B ( $p < 0,0001$ ) y B versus C ( $p < 0,001$ ). La disminución en la concentración de tolueno a 18°C es relevante en el contenedor A en comparación a B y C, alcanzando un porcentaje de pérdida cercano a un 70% (gráfico 2). Esto se debe a que el sistema de recolección no es hermético.

El contenedor A presenta una disminución decreciente en la concentración de tolueno en orina a ambas temperaturas (grafico 1), alcanzando una pérdida de un 12% al tercer día de almacenamiento a 4°C y en los días restantes los porcentajes llegan hasta un 48% en el día 14, siendo significativos respecto a la concentración media inicial detectada en el día control ( $p < 0,001$ ). A 18°C estos porcentajes son más elevados, siendo significativos desde el primer día de almacenamiento ( $p < 0,001$ ).

La concentración del solvente en el contenedor C tiene un comportamiento similar al contenedor A, presentando una menor pérdida en la concentración media inicial cercana a un 6% a 4°C al quinto día de almacenamiento. A partir del séptimo día se producen pérdidas significativas ( $p < 0,01$ ).

Por otra parte, es importante destacar que el contenedor B presenta un incremento variable en la concentración inicial a ambas temperaturas de almacenamiento en el transcurso de los 14 días, siendo significativo este aumento en el día 3 ( $p < 0,0001$ ) y día 7 de conservación ( $p < 0,001$ ). Esta inestabilidad durante el periodo completo de almacenamiento es independiente de la temperatura de conservación, y se puede atribuir a la manipulación durante la transferencia de la muestra de orina desde el frasco de recolección al contenedor de almacenamiento. Ensayos previos han reportado que la presencia de

tolueno en el ambiente puede producir contaminación del espécimen durante la etapa de toma de muestra (Ducos *et al.*, 2008).

## CONCLUSIÓN

Se demuestra que la estabilidad del tolueno es dependiente de la temperatura de almacenamiento, por lo tanto, las muestras deben ser transportadas y almacenadas en cadena de frío en un rango de temperatura de 2°C a 8°C para evitar volatilidad del solvente.

El presente estudio aporta datos que demuestran que el sistema de recolección más apropiado para muestrear tolueno en orina es el contenedor C de polipropileno estéril con tubo al vacío, debido a que presenta menor variabilidad manteniendo estable la concentración inicial del solvente en la matriz biológica hasta el quinto día de almacenamiento a 4°C.

El contenedor C presenta ventajas en la toma de muestra sobre los contenedores A y B, ya que permite una transferencia limpia y directa de la muestra de orina a un tubo al vacío de 9 mL, recolectando una muestra homogénea y representativa para posterior análisis. Además, otras ventajas de este sistema de recolección es la disminución de la pérdida del analito producto de su simple manipulación, menor espacio cabeza en el tubo al vacío y hermeticidad del mismo, en conjunto con su fácil transporte y conservación posterior a la toma de muestra.

Este estudio queda a libre disposición a nuevas investigaciones con la finalidad de fortalecer lo anteriormente expuestos utilizando muestras de trabajadores expuestos a tolueno o buscar nuevas hipótesis realizando pruebas con otros volátiles orgánicos en matriz orina.

## BIBLIOGRAFÍA

Biologic Markers in Urinary Toxicology, National Academies Press Subcommittee on Biologic Markers in Urinary Toxicology, National Research Council (1995): 15-22, 53-78 pp.

Decharat, S. (2016). Urinary Hippuric Acid and Toluene Levels in Workers of Printing Factories in Thailand. *Int J Occup Hyg*, 8:85-92.

Ministerio de Salud, MINSAL. (2018). Decreto Supremo N° 594. Reglamento Sanitario sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los Lugares de Trabajo.

Ducos, P, Berode, M., Francin, J., Arnoux, C. & Lefèvre. (2008). Biological monitoring of exposure to solvents using the chemical itself in urine: application to toluene. *Int Arch Occup Environ Health*, 81:273–284

Fustinoni, S., Buratti, M. & Giampiccolo R. (2000) Comparison Between blood and urinary toluene as biomarkers of exposure to toluene. *Int Arch Occup Environ Health*, 73: 389-396.

Gill, R., Hatchett, S. & Osselton, D. (1988). Sample Handling and storage for the quantitative analysis of volatile compounds in blood: The determination of toluene by Headspace Gas Chromatography. *J Anal Toxicol*, 12: 141-146.

Instituto de Salud Pública de Chile, ISPCH. (2013), Manual básico sobre mediciones y toma de muestras ambientales y biológicas en Salud Ocupacional.

Janasik, B., Jakubowski, M., Giampiccolo, R. & Jalowiecki, P. (2008). Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylene) in urine as result of experimental human volunteer exposure. *Int Arch Occup Environ Health*, 81:443-449.

Jeong, Y., Suh, S., In, M., Paeng, K. & Kim, Y. (2016). Determination of Toluene and Ethanol in Urine by Headspace and Cryotrapping Gas Chromatography – MASS Spectrometry. *J Anal Lett*, 50: 1260-1275.

Kawai, T., Yasugi, T., Mizunuma, K, Horiguchi, S. & 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*, 64: 223-234.

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

National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH (2016). Manual of Analytical Methods (NMAM), 5th ed. Acetone and methyl ethyl ketone in urine: Method 8319.