

VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HALOTANO EN ORINA COMO INSTRUMENTO DE EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINING HALOTHANE IN URINE AS AN INSTRUMENT FOR EVALUATING OCCUPATIONAL EXPOSURE

Rita María González Chamorro ¹

Arelis Jaime Novas ²

Heliadora Díaz Padrón ³

José Antonio Arias Verdés ⁴

Gonzalo Dierksmeier ⁵

María Elena González Chamorro ⁶

Ana Miriam Galindo García ⁷

Lilian Villalba Rodríguez ⁸

RESUMEN

La exposición ambiental profesional a sustancias nocivas puede condicionar la aparición de determinados cambios significativos en la fisiología normal del organismo cuando no se toman a tiempo las medidas de seguridad adecuadas para un puesto de trabajo dado en el que el riesgo puede estar presente. Entre los riesgos químicos que enfrenta el personal trabajador de salud se encuentran los agentes anestésicos inhalables. Con el objetivo de dar los primeros pasos para la implantación de un sistema de vigilancia epidemiológica a este personal, se validó una técnica de determinación de este anestésico en orina con las condiciones instrumentales creadas en nuestro laboratorio. Para realizar esta validación se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, precisión, veracidad, límite de detección y límite de cuantificación, y se calculó la incertidumbre del método. En el procedimiento de validación se encontró que la técnica es específica y precisa, el límite de detección fue de 0,118 µg/L y el de cuantificación de 0,354 µg/L, la incertidumbre global fue de 0,243 y la expandida de 0,486. El método, validado conjuntamente con la posterior implantación de los límites biológicos de exposición, servirá como un medio auxiliar de diagnóstico que nos permita el control periódico de la exposición en este personal.

Palabras clave: exposición ocupacional, halotano en orina, validación de ensayo

ABSTRACT

The occupational exposure to harmful substances may impose the apparition of determined significant changes in the normal physiology of the organism when the adequate security measures

are not taken in time in a working place where the risk may be present. Among the chemical risks that may affect the workers' health are the inhalable anesthetic agents. With the objective to take the first steps for the introduction of an epidemiological surveillance system to this personnel, an analytical method for determining this anesthetic in urine was validated with the instrumental conditions created in our laboratory. To carry out this validation the following parameters were taken into account: specificity, linearity, precision, accuracy, detection limit and quantification limit, and the uncertainty of the method was calculated. In the validation procedure it was found that the technique is specific and precise, the detection limit was of 0,118 µg/L, and of the quantification limit of 0,354 µg/L. The global uncertainty was of 0,243, and the expanded of 0,486. The validated method, together with the posterior introduction of the biological exposure limits, will serve as an auxiliary means of diagnosis which will allow us a periodical control of the personnel exposure.

Key words: occupational exposure, halothane in urine, test validation

INTRODUCCIÓN

El Plan Global de Acción sobre la Salud de los Trabajadores de la Organización Mundial de la Salud llama a todos los países a desarrollar programas nacionales de salud ocupacional para los trabajadores de

¹ Licenciada en Química, Máster en Química, Investigadora Agregado. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

² Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Máster en Química Farmacéutica, Investigadora Auxiliar. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

³ Ingeniera química, Máster en Salud de los Trabajadores, Investigadora Auxiliar, Profesora Instructor. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

⁴ Licenciado en Química, Investigador Agregado. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, La Habana, Cuba

⁵ Licenciado en Química, Doctor en Ciencias Químicas, Investigador Titular, Profesor Titular. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba

⁶ Licenciada en Lengua Inglesa, Profesora Auxiliar. Facultad de Ciencias Médicas 'Julio Trigo López', La Habana, Cuba

⁷ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Vicedirección de Atención Médica, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

⁸ Técnica en Química Industrial. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

Correspondencia:

Lic. Rita María González Chamorro
Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores
Calzada de Bejucal km 7 1/2, Apartado 9064, CP10900, Arroyo Naranjo, La Habana, Cuba
E-mail: ritamg@infomed.sld.cu

la salud, los cuales se encuentran en un ambiente con múltiples factores de riesgos biológicos, químicos, físicos, ergonómicos y psicosociales¹.

Entre los riesgos químicos que enfrenta el personal trabajador de salud se encuentran los agentes anestésicos inhalables. Existen dos tipos de poblaciones expuestas: los pacientes, para quienes la exposición es deliberada, y el personal que labora en los quirófanos, para quienes la exposición es una consecuencia no deseada de su ambiente de trabajo².

En la década de 1950-1960 se comenzó a utilizar halotano como anestésico inhalable, el cual se absorbe rápidamente en forma de vapor a través de las membranas de los alvéolos pulmonares. Debido a su alto coeficiente de distribución entre la sangre y la fase gaseosa, se alcanzan concentraciones sanguíneas de halotano en períodos relativamente cortos que oscilan entre 20 minutos y algunas horas, en dependencia, por supuesto, de las concentraciones a que se haya estado expuesto. Ya en la sangre, este compuesto se distribuye y se metaboliza con rapidez en el organismo³.

Después de una exposición prolongada a los vapores de halotano en los ambientes laborales, se atribuyen diferentes efectos adversos, entre los cuales se encuentran alteraciones en la conducta y en la respuesta a pruebas psicométricas; se han observado trastornos de la percepción, cognoscitivos y de habilidad motora en voluntarios expuestos a trazas de gases anestésicos. Se ha reportado en anesthesiólogos una frecuencia de suicidios muy elevada. La Sociedad Americana de Anestesiología ha calificado éste como el principal problema de salud de los anesthesiólogos menores de 55 años⁴.

Los efectos de la exposición crónica a estos agentes han estado relacionados con eventos de infertilidad y abortos espontáneos, e incluso en mujeres de hombres expuestos, aumento de malformaciones congénitas en hijos de madres expuestas, riesgos de cáncer, afectaciones generales en el sistema nervioso central, disminución del apetito y depresión respiratoria, y puede asociarse también a eventos hepatotóxicos leves (tempranos) o graves, a menudo fatales (tardíos)^{4,5,6}. En nuestro país se han realizado estudios tanto en el ambiente ocupacional como de evaluación neuroconductuales y del estado de salud de estos trabajadores; los resultados han arrojado valores de concentraciones por encima de los establecidos; así como alteraciones de salud en el personal sometido al riesgo^{7,8}.

Todos estos hallazgos condicionan la necesidad de realizar estudios más profundos e integrales, teniendo en cuenta la exposición individual que se determina de forma efectiva a través del monitoreo biológico. Es conocido que el bioindicador idóneo para ello es la determinación de ácido trifluoroacético en sangre, pero no se cuenta con una técnica de determinación de este metabolito del halotano con las condiciones instrumentales dadas que permitan su desarrollo en nuestro laboratorio. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos validar un método analítico por cromatografía de gases para la determinación de halotano

en orina. A pesar que no existen límites biológicos de exposición para el mismo, con los resultados obtenidos se dan en nuestro país los primeros pasos, para, conjuntamente con otras investigaciones a nivel internacional, poder fijar estos valores, que constituirán un medio auxiliar de diagnóstico útil para delimitar hasta qué nivel de exposición puede permanecer el trabajador bajo las influencias de ese ambiente laboral sin enfermar, y de esta forma aportar elementos objetivos para el establecimiento de un programa de vigilancia que se cree al efecto, que permitirá prevenir y actuar con más precisión y efectividad en las acciones.

MATERIAL Y MÉTODO

En nuestro trabajo fue seleccionado como referencia para trazar las estrategias de validación los "Lineamientos armonizados para la validación de métodos de análisis en un laboratorio (reporte técnico)", auspiciado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC). En este reporte se describen todos los requerimientos de los parámetros individuales por los cuales un método puede ser caracterizado, como son: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación, entre otros⁹.

Validación del método de ensayo

La validación de métodos es un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos fiables^{2,7}. Éste emplea un conjunto de pruebas que comprueban todas las hipótesis en las que se basa el método analítico y establece y documenta las características de rendimiento de un método, demostrando así si dicho método es adecuado para un propósito analítico particular. Las características de rendimiento de los métodos analíticos son: la aplicabilidad, la selectividad, la calibración, la veracidad, la exactitud, la recuperación, el rango de funcionamiento, el límite de cuantificación, el límite de detección, la sensibilidad y la robustez. Pueden añadirse la incertidumbre de la medición y la adecuación al propósito¹⁰.

La validación del método para determinar halotano en orina se realizó por cromatografía de gases con detector de captura electrónica de Ni₆₃ e introducción de la muestra por espacio de cabeza estático (static head space). Para la identificación y cuantificación del halotano en las muestras, éstas se colocaron en incubación y agitación durante 20 min a 50°C en un equipo de head space marca DANI HSS 86.50, y se inyectó automáticamente 1mL del espacio de cabeza con una relación de split 1:14 en un cromatógrafo Dani GC 1000, a una temperatura de 150°C, utilizando una columna capilar de 10 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno, recubierta con Poraplot Q. Los picos cromatográficos fueron captados mediante un software

DDS1.7. La fase móvil empleada fue nitrógeno de alta pureza a una velocidad de flujo de 1,6 mL/min, equivalente a una presión de 0,22 Bar en el modo de flujo constante. Se estableció una temperatura de 325°C para el detector de captura electrónica y una sensibilidad de 0,8 mA.

La temperatura de programación del horno para obtener una resolución adecuada del halotano fue la siguiente: temperatura inicial 70 °C (1min); gradiente de temperatura 40°C/min; temperatura intermedia 130°C; gradiente de temperatura 5 C/min; temperatura final 180°C (2 min).

Para llevar a cabo la validación del método, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, precisión, veracidad, límite de detección y límite de cuantificación, y se calculó la incertidumbre del método.

Tratamiento estadístico de la validación

Los resultados se sometieron a tratamientos estadísticos descriptivos. Se calcularon las medias, los coeficientes de variación (CV) y las desviaciones estándares (S) para todo el procesamiento. Se realizó una prueba de correlación de Pearson y se calculó el coeficiente de determinación en la curva de calibración.

Se realizó también un análisis de varianza de clasificación simple con un nivel de significación del 5%, para determinar si existían diferencias significativas entre los valores de recobrado obtenidos para los tres niveles de concentración empleados en los estudios de veracidad. Se utilizó como prueba a posteriori la de Scheffé.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del procedimiento de análisis

• Especificidad

El detector de captura de electrones es un detector de ionización altamente sensible y es muy útil en la determinación de trazas de compuestos con afinidad electrónica, como es nuestro caso ¹¹.

En la figura 1 se observa el cromatograma de la muestra de orina blanco, y la figura 2 el cromatograma de la muestra de orina de trabajadores expuestos a halotano e isoflurano, gases anestésicos utilizados en los salones de operaciones, donde se puede ver que los picos de ambos se resuelven adecuadamente con tiempos de retención de 8,03 y 7,01 min, respectivamente. En la muestra blanco no se observa interferencia alguna. El programa de temperatura utilizado es capaz de separar los anestésicos que puedan estar presentes en la orina del personal expuesto.

• Linealidad y rango de trabajo

En la figura 3 aparece el gráfico de calibración y la ecuación de regresión (por mínimos cuadrados) con pendiente de 32,56 e intercepto de 15,78, que relaciona las áreas promedio de cada pico calculado a través del software DDS 1000 – Dani Data Station (Estación de datos Dani) y la concentración de halotano en el rango de 0,41 a 20,57 µg/L, con un coeficiente de determinación de 0,995 y de correlación de 0,997.

Figura 1
Cromatograma de una muestra blanco de orina

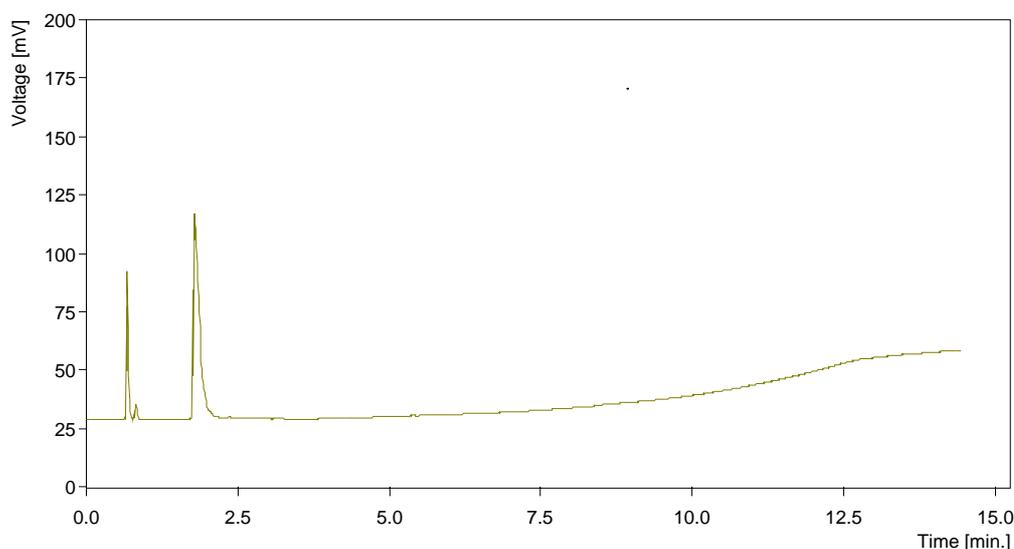


Figura 2
Cromatograma de muestra de orina contaminada de un trabajador expuesto a halotano e isoflurano

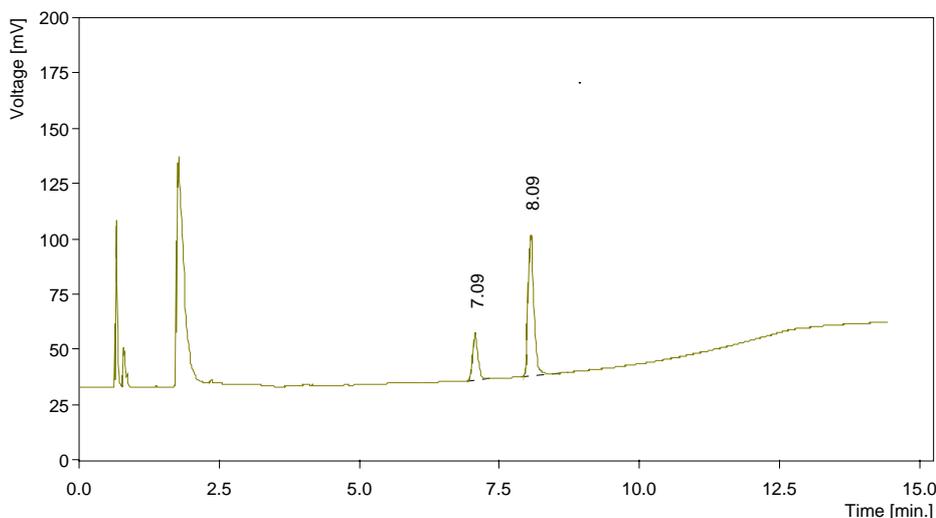
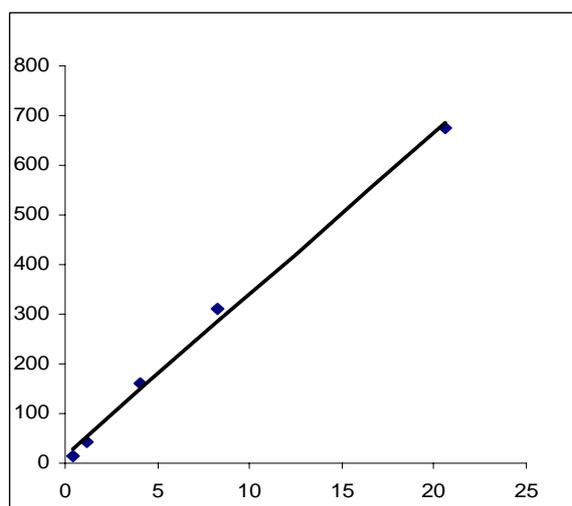


Figura 3
Gráfico de calibración y ecuación de regresión de la recta



Ecuación de regresión: $\hat{y} = 15,78 + 32,56 x$

El estudio de la linealidad demostró que el valor máximo dentro del rango lineal es de 20,57 µg/L de halotano en orina; concentraciones mayores tienden a producir una pérdida de la linealidad, lo cual es indicativo que en ese rango el detector no presenta una respuesta lineal.

En un estudio realizado por Accorsi y col. se obtiene un rango de trabajo lineal más amplio (de 0,2 a 80 µg/L), utilizando cromatografía gaseosa con detector de masa¹².

• **Precisión**

• **Repetibilidad**

En el análisis de la muestra de orina se obtuvo una concentración media de 11,97 µg/L, siendo la repetibilidad de 1,35 µg/L con un coeficiente de

variación de 5,92%. En el trabajo realizado por Imbriani utilizando head space y detector de masa, se obtuvo un coeficiente de variación de 3,2% para 10 determinaciones, con un valor medio de 20 µg/L. En otro estudio ejecutado por Accorsi a tres niveles de concentración, se obtuvieron coeficientes de variación que oscilaron entre 3,5 y 6,8 %. Buratti y col. reportaron coeficientes de variación menores que 7%^{12,13,14}.

El coeficiente de variación en condiciones óptimas debe estar dentro del rango permisible para el método utilizado, por lo que los resultados obtenidos se encuentran entre los parámetros informados por la literatura consultada y dentro de los límites especificados por los lineamientos armonizados para la validación de métodos de análisis en

un laboratorio (reporte técnico), auspiciado por la IUPAC, ISO y AOAC⁹.

• **Precisión intermedia**

Se observó una tendencia a la disminución pequeña de la concentración de halotano en una muestra almacenada en el transcurso de los días, máximo de una semana, con una concentración media de 13 µg/L, precisión intermedia de 2,2 µg/L y un coeficiente de variación de 8,36 %. Esto nos indica que la muestra de orina puede almacenarse hasta una semana, como tiempo máximo sin alterarse.

Los coeficientes de variación son mayores cuando se trabaja a concentraciones pequeñas, de-

bido a que la posibilidad de cometer errores es mayor; tal es el caso del estudio realizado por Accorsi y col. en Italia, donde obtuvieron un coeficiente de variación de 11,9 % a una concentración de 0,75 µg/L, y a 74,8 µg/L se obtuvo un 9,1 %¹².

• **Veracidad**

En la tabla 1 se expresan los recobrados de las muestras del blanco de orina, contaminadas con halotano en el rango de 1,64 a 10,28 µg/L. Los valores de recuperación media se encontraron entre 97 y 102,2% con un coeficiente de variación máximo de 4,12%. Imbriani y col. informaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo (97-103%)¹³.

Tabla 1
Recobrados obtenidos a tres niveles de concentraciones diferentes

Concentración teórica (µg/L)	Concentración media experimental (µg/L)	DS	CV	Recobrado (%)
1,64	1,60	0,07	4,12	97,00
4,11	4,04	0,17	4,11	98,35
10,28	10,51	0,18	1,67	102,20

Al comparar estadísticamente los recobrados mediante análisis de varianza y una prueba a posteriori de Scheffé, las medias de los recobrados no presentaron diferencias significativas para p<0,05, por lo que se puede expresar el recobrado como un promedio, estableciéndose un valor de 99,18%, con una desviación estándar de 0,14 y un coeficiente de variación de 3,3%.

• **Límite de detección y de cuantificación**

El límite de detección hallado fue de 0,118 µg/L y el de cuantificación de 0,354 µg/L. Estos resultados fueron satisfactorios para los niveles de concentración tan bajos en que se encuentran algunas de las muestras. En otros estudios se han informado límites de detección más bajos de 0,05 y 0,1µg/L, utilizando un detector de masa^{12,13}.

• **Cálculo de la incertidumbre del método**

La incertidumbre global del método se determina mediante la identificación de las fuentes de incertidumbre del método debido a la imprecisión, verificación de la trazabilidad y a la heterogeneidad de la muestra, utilizando la expresión siguiente^{15,16}:

$$U = K \cdot \sqrt{U_{prec}^2 + U_{traz}^2 + U_{homog}^2}$$

• **Incertidumbre debida a la precisión intermedia**

La incertidumbre debida a la precisión corres-

ponde a la precisión intermedia del método analítico. La precisión intermedia del método se pudo obtener a partir del análisis de una muestra de orina natural contaminada y analizada durante una semana.

La desviación estándar (S_p) de todos los resultados obtenidos al analizar la muestra de orina natural contaminada, alcanzó un valor de 2,2, y como N es el número de veces que se analiza la muestra en condiciones intermedias (normalmente, N=1), podemos afirmar que la incertidumbre debida a la precisión intermedia fue de 2,2.

• **Incertidumbre debido al error**

El error del procedimiento analítico se investigó durante el estudio de validación interna del método en el laboratorio utilizando muestras de orina contaminadas a tres niveles y por triplicado.

La desviación estándar (S) media de los tres niveles de recobrado fue de 0,14, que dividido entre la raíz cuadrada del número total de resultados (n) obtuvimos una incertidumbre debida al error igual a 0,047.

Como el recobrado medio para los tres niveles de contaminación fue de 99,18%, aplicando la prueba t para el recobrado tenemos que para 8 grados de libertad y 95 % de confianza, la t_{tabulada} es igual a 1,86. En este caso la t_{cal} < t_{tab} (0,174 < 1,86), por lo que el recobrado no difiere significativamente de la unidad.

La incertidumbre del error, de acuerdo a los cálculos toma el valor de 0,178.

• **Otras fuentes de incertidumbre**

La pureza del material de referencia informada por el productor fue de $(99,9 \pm 0,1)\%$. Asumiendo una distribución rectangular, la pureza tiene una in-

certidumbre de 0,000578.

En la tabla 2 aparece un resumen de todas las incertidumbres calculadas para el método analítico validado.

Tabla 2
Estimado global de la incertidumbre

Descripción	Concentración	Incertidumbre normal	Incertidumbre normal relativa [U(x)/X]	Comentarios
Precisión	13 µg/mL	2,2 µg/mL	0,169	Muestra de paciente, separada en frascos individuales y analizada en un período de 8 días
Error	0,9918	0,178	0,179	Muestras contaminadas para recobrados
Pureza estándar	1	0,00058	0,00058	

• **Cálculo de la incertidumbre combinada global**

La incertidumbre combinada global se calcula teniendo en cuenta las incertidumbres relativas:

• **Incertidumbre expandida**

$$U_{exp} = k U_{(c)} = 2 \cdot 0,247 = 0,494$$

La incertidumbre global del método validado tuvo un valor de 0,247 y la expandida de 0,494.

Como conclusión global del estudio de validación practicado, el método analítico propuesto puede ser utilizado con suficiente confianza para determinar las concentraciones de halotano en orina al personal expuesto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilburn S, Pule T. Nacional occupational health programe for healthcare workers. The Global Occupational Health Network. GOHNET N° 13. Geneva: World Health Organization; 2007. p. 4-8.
2. Pezzano G, Imbriani M, Ghittori S, Chapoda lió E. Indicadores biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales: Anestésicos por vía inhalatoria [citado 6 Oct 2008]. Disponible en: <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/Documentos/V.4049-1997.pdf>
3. Greim H, Lehnert G, eds. Biological exposure values for occupational toxicants. Critical data evaluation for BAT and EKA values. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1995.
4. Ministerio de Sanidad y Consumo (España). Protocolo de vigilancia sanitaria específica. Agentes anestésicos inhalatorios. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2001.
5. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP-141: Exposición laboral a gases anestésicos [sitio

en internet.]. [Citado 6 Oct 2008]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp_141.pdf.

6. Carreras E. Bibliografía sobre toxicidad de gases anestésicos usados en quirófanos. ITB/170.83. Madrid: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 1983.
7. González PJ, Díaz H, González FJ, Ibarra E. Contaminación ambiental por vapores anestésicos en salones de operaciones. Su prevención. Revista Cubana de Salud y Trabajo 2000;1(1);11-3.
8. Almirall PJ, Rodríguez A, Hernández JS, Linares ME, López GM Evaluación neuroconductual y estado de salud en trabajadores de salones de operaciones. Revista Cubana de Salud y Trabajo 2006;7(1-2).
9. International Symposium on the Harmonisation of Quality Assurance Systems in Chemical Laboratory. Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis. ISO, IUPAC and AOAC International. Budapest; 2005.
10. Resolución OENO 8/2005. Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio (informe técnico) Resultados del Simposio sobre Armonización de Sistemas de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos. Budapest, Hungría, 4-5 de noviembre de 1999 (patrocinado por IUPAC, ISO y AOAC International).
11. Dierksmeier G. Métodos cromatográficos. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2005
12. Accorsi A, Barbieri A, Raffi GB, Violante FS. Biomonitoring of exposure to nitrous oxide, sevoflurane, isoflurane and halothane by automated GC/MS headspace urinalysis. Int Arch Occup Environ Health 2001;74(8):541-8.
13. Imbriani M, Ghittori S, Zadra P, Imberti R. Biological monitoring of the occupational exposure to halothane (fluorothane) in operating room personnel. Am J Ind Med 1991;20(1):103-12.

14. Buratti M, Pellegrino O, Valla C, Colombi A. Biological monitoring of occupational exposure to inhalation anaesthetics Determination of urinary nitrous oxide, halothane and isoflurane. *Med Lav* 1993;84(1):66-73.
15. Maroto A, Riu J, Roqué R, Rius FX. Trends in Analytical Chemistry. Evaluating uncertainty in routine analysis 1999;18:577-84.
16. Maroto. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tesis doctoral. Tarragona: Facultad de Química; 2002.
15. Maroto A, Riu J, Roqué R, Rius FX. Trends in

Recibido: 24 de noviembre de 2009

Aprobado: 23 de febrero de 2011