

ANILINA

VLA

DOCUMENTACIÓN TOXICOLÓGICA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL LÍMITE DE EXPOSICIÓN PROFESIONAL DE LA ANILINA

DLEP 132

2020

VLA-ED®: 2 ppm (7,74 mg/m³)

VLA-EC®: 5 ppm (19,35 mg/m³)

Notación: Sen, vía dérmica

Sinónimos: Bencenamina, Aminobenceno, Felinamina

N° CAS: 62-53-3

N° CE: 200-539-3

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La anilina recién destilada es un líquido oleoso, entre incoloro y ligeramente amarillo y de olor característico. Se oscurece con la luz y al aire. No se evapora fácilmente a temperatura ambiente. La anilina es levemente soluble en agua y se mezcla fácilmente con la mayoría de los disolventes orgánicos. Es una base débil.

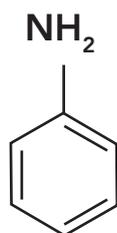
Factor de conversión: 1 ppm = 3,87 mg/m³

(25°C, 101,3 kPa) 1 mg/m³ = 0,258 ppm

Peso molecular: 93,1

Fórmula molecular: C₆H₇N

Fórmula estructural:



Solubilidad en agua:	34 g/l a 20°C
Punto de fusión:	-6°C
Punto de ebullición:	184,1°C
Presión de vapor:	40 Pa a 20°C
Densidad:	1,0217 g/cm ³ a 20°C
Punto de inflamación:	76°C
Límite de explosividad:	1,2% – 11,0% (concentración en aire)
Log P_{ow}:	0,94

USO MÁS FRECUENTES

La anilina es una amina aromática que se utiliza como materia prima en la industria química para la síntesis orgánica de numerosos productos como tintes y colorantes, isocianatos, productos fitosanitarios (herbicidas y fungicidas), farmacéuticos, explosivos o de química fina. Esta sustancia también se usa en la industria de los polímeros para la fabricación de intermedios en la síntesis de los poliuretanos, así como en la industria del caucho como antioxidante y acelerador de vulcanización. Además, la anilina se emplea como disolvente en la elaboración de perfumes, barnices y resinas. En el ambiente laboral se halla principalmente en estado vapor (NTP 584)

INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

El principal efecto que produce la exposición a anilina es la formación de metahemoglobina (Met-Hb) y los cuerpos de Heinz en los eritrocitos. La Met-Hb es una forma inactiva, incapaz de combinarse de modo reversible con el

oxígeno. Puede dar lugar a hipoxemia y hemólisis y por tanto anemia.

Como resultado de los efectos tóxicos sobre los eritrocitos tiene lugar el daño en el sistema hematopoyético. El bazo, en particular, puede dañarse por el aumento de la degradación de los eritrocitos dañados y la consiguiente sobrecarga de desechos celulares, hemoglobina (Hb) y hierro redox activo. Otro aspecto en los estudios en animales es el aumento de la hematopoyesis extramedular en el bazo.

Toxicocinética

Estudios en humanos

La anilina se absorbe muy bien por vía inhalatoria, oral y dérmica. Por vía dérmica se absorbe tanto en fase vapor como líquida. La absorción dérmica aumenta con el aumento de la temperatura y la humedad de la piel. La alteración de la piel, por ejemplo eritema, facilita la absorción de la anilina por esta vía (Korinth G. *et al.*, 2007).

El metabolismo de la anilina y la excreción es cualitativamente similar en humanos y animales. Se absorbe rápidamente, se distribuye en los tejidos, se metaboliza y luego se excreta, principalmente, en la orina. La vida media en humanos es de 3,5 h (DFG, 1993). Sin embargo, uno de los metabolitos, el nitrosobenceno puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo del glutatión y las proteínas, por ejemplo albúmina y hemoglobina, y estos conjugados pueden permanecer más tiempo en el organismo (Lewalter y Korallus, 1985).

Cuantitativamente, solo una pequeña fracción de la anilina absorbida se elimina sin cambios en la orina y el aire exhalado (ACGIH, 2001) y el metabolismo es la principal vía de eliminación. El metabolismo de la anilina es complejo; se metaboliza inicialmente en el hígado mediante tres rutas metabólicas: N-acetilación, hidroxilación de anillo aromático y N-hidroxilación.

La principal ruta metabólica y detoxificante es la N-acetilación a N-acetilani-lina, con posterior oxidación a N-acetil-p-aminofenol, el cual se conjuga con ácido glucurónico o con ácido sulfúrico. Alrededor del 50% de los europeos muestra una baja actividad de la enzima N-acetiltransferasa, los llamados "acetiladores lentos". Esto conduce a un retraso de la N-acetilación (ECB, 2004).

También se produce la hidroxilación del anillo aromático; en el hombre, el metabolito mayoritario es p-aminofenol, que es excretado por la orina conjugado con glucurónido o con sulfato.

En especies animales se ha observado la hidroxilación en las posiciones orto y meta. Pequeñas cantidades de anilina se hidroxilan a 2,4-aminofenol que también se conjugan y se excretan en la orina.

Además, las enzimas del hígado pueden catalizar la N-hidroxilación de la anilina dando lugar a fenilhidroxilamina que es transportada por los eritrocitos, donde se oxida a nitrosobenceno con la formación de Met-Hb. El nitrosobenceno puede reaccionar con grupos sulfhidrilo de glutatión y proteínas, por ejemplo: albúmina y hemoglobina. Estos aductos son estables y detectables mucho después de que haya cesado la exposición y que la anilina y otros metabolitos hayan sido eliminados (Lewalter y Korallus, 1985). Se ha observado un aumento del nivel de aductos de hemoglobina en los que son acetiladores lentos. Por el contrario, los niveles de Met-Hb y la excreción de anilina no dependen de la mayor o menor actividad de la N-acetiltransferasa.

La toxicidad de la anilina se explica por la capacidad del nitrosobenceno para formar aductos (uniones covalentes) con las proteínas de los eritrocitos, dañándolos gravemente. Así, la fenilhidroxilamina y el nitrosobenceno juegan un papel muy importante en el mecanismo de acción tóxica de la anilina. Por lo tanto, la formación de Met-Hb se considera como un indicador del potencial tóxico en la exposición a la anilina.

Käfferlein *et al.* (2014) realizaron un estudio de exposición controlada con

voluntarios. En el ensayo piloto, 2 hombres y 2 mujeres estuvieron expuestos durante 8 horas a 2 ppm de anilina en el ambiente. La exposición se realizó a intervalos de 4 x 2 horas, con descansos de 15 minutos entre ellos para facilitar la toma de muestra de sangre. Mientras estaban expuestos realizaron ejercicio durante 4 periodos de 20 min en un cicloergómetro, lo que dio como resultado un aumento de los niveles de Met-Hb de hasta el 1,6%, con una meseta después de 6 horas. La excreción máxima de anilina en la orina después de la exposición fue de 306 µg/l.

El siguiente estudio de Käfferlein *et al.* (2014) fue con 10 hombres y 9 mujeres, no fumadores, que estuvieron expuestos a 2 ppm de anilina durante 6 horas. Este período se dividió en 3 intervalos de 2 horas, con descansos de 15 minutos para tomar muestras de sangre. En cada intervalo realizaron ejercicio en un cicloergómetro durante 20 min (la tasa de ventilación media fue de 30 l/min durante el ejercicio). El nivel basal de Met-Hb previo a la exposición fue de $0,72 \pm 0,19\%$. Después de la exposición el nivel máximo de Met-Hb en la sangre fue de $1,21 \pm 0,29\%$ (intervalo: 0,8-2,07%) y la excreción de anilina en la orina fue $168,0 \pm 51,8$ µg/l (intervalo: $79,5 \pm 418,3$ µg/l). Después de 24 horas, el nivel medio de Met-Hb volvió al nivel basal ($0,65 \pm 0,18\%$). No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres.

En el estudio de Käfferlein *et al.* (2014) se muestra que una exposición única

a anilina durante 6-8 horas produce niveles de Met-Hb, que están por debajo del nivel del 2%. Los datos también confirman que no habrá arrastre de Met-Hb elevada al siguiente día de trabajo con exposición diaria repetitiva.

Estudios en animales

La anilina se absorbe bien por todas las vías de administración. La absorción oral asciende a más del 90% en ratas y al 56%, 72% y 80% en cerdos, ratones y ovejas respectivamente (ECB, 2004).

La anilina se distribuye ampliamente, las concentraciones más altas se encuentran en los glóbulos rojos, plasma, bazo, riñón, hígado, vejiga y el tracto gastrointestinal. Debido a su carácter básico la anilina y la N-acetil anilina se produce una circulación enterohepática (ECB, 2004).

La anilina puede atravesar la placenta. Se ha observado una concentración de anilina ligeramente mayor en sangre fetal que en sangre materna de ratas, mientras que la vida media es de 1,5 h en el plasma sanguíneo fetal y en el materno (SCOEL, 2015).

Después de una única aplicación dérmica de anilina a ratas y ratones, la mayoría de la dosis se excreta como metabolitos en 24 horas en la orina (HSE, 1997).

Aunque la N-hidroxilación es una ruta metabólica menor, es el paso más importante en la bioactivación de la anilina. Se forma nitrosobenceno y Met-Hb (Met-Hb).

En condiciones normales, la Met-Hb se reduce de nuevo mediante la metahemoglobina reductasa, que es el único sistema que mantiene la Hb en su estado reducido portador de oxígeno (y por lo tanto niveles de Met-Hb en o por debajo del 1%) y es la enzima limitante que controla la toxicocinética de la reducción de Met-Hb. Las investigaciones comparativas han mostrado diferencias específicas de especie con una actividad cinco y diez veces mayor de metahemoglobina reductasa en eritrocitos de ratas y ratones que en eritrocitos humanos (ECB, 2004).

Por otro lado, la actividad de la metahemoglobina reductasa en perros Beagle es menor que en roedores y en humanos. Dado que los perros Beagle también carecen de N acetiltransferasa, son mucho más susceptibles a la metahemoglobinemia que incluso los humanos de acetilación lenta (Pauluhn, 2005).

Estudios *in vitro*

A partir del estudio comparativo de penetración percutánea de varios productos químicos, incluida la anilina, (Korinth *et al.*, 2012), la estimación del flujo para la anilina fue de $752,2 \pm 213,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Este estudio, junto con otros, apoyan la asignación de una notación "vía dérmica" (SCOEL, 2015).

Irritación y corrosividad

Estudios en humanos

La anilina tiene un olor característico y penetrante, detectable a 1 ppm (ACGIH

2001). Aunque la anilina se ha usado en gran variedad de aplicaciones industriales durante muchos años, no hay datos disponibles sobre los efectos irritantes locales en los ojos, la piel o las membranas mucosas. Además, no se describieron tales efectos en estudios clínicos en humanos.

Estudios en animales

Piel

En las pruebas estándar de irritación, la aplicación de anilina no diluida sólo causó eritema leve en la piel de los conejos. Sin embargo, en otra prueba, tras una única aplicación de 100-900 mg/kg de peso corporal en la piel de ratas y conejos, se observó signos de dermatitis a los 3-5 días, que se resolvió después de 2-3 semanas. En una prueba, cuyo objetivo era estudiar la toxicidad dérmica aguda de la anilina, los conejos desarrollaron hemorragias subdérmicas y eritema severo después de la exposición dérmica a la anilina sin diluir (SCOEL, 2015).

Ojos

Después de la instilación de anilina no diluida en ojos de conejos, se detectaron opacidad corneal grave, eritema conjuntival severo y edema que no fueron reversibles en 8 días. En otras pruebas, la anilina sin diluir produjo lagrimeo, inflamación de la conjuntiva y daño a la córnea, pero los efectos desaparecieron en 24-48 horas. Se observaron efectos comparables después de la aplicación de una solución acuosa saturada de anilina (ECB 2004).

Sensibilización

Estudios en humanos

En pruebas de parche se han observado reacciones positivas en encuestas de control y en estudios con pacientes que sufren dermatitis eczematosa. En estos casos, las reacciones positivas a menudo se asocian con una alergia grupal a otras aminas aromáticas, que están sustituidas en la posición para (reactividad cruzada del compuesto del grupo para) (ECB 2004).

Estudios en animales

El potencial de sensibilización de la piel producido por la anilina se investigó en un estudio en el que se utilizaron tres protocolos diferentes con 10 cobayas en cada tratamiento y 4 en cada grupo de control. No se pudo detectar sensibilización de la piel en una prueba de Draize modificada. Sí se observó una reacción positiva en 1 de 10 animales en la prueba Magnusson-Kligman. La respuesta más fuerte se observó en el ensayo de inyección única con adyuvante (SIAT). Se produjeron reacciones positivas en 5 de las 10 cobayas (SCOEL, 2015).

Toxicidad aguda

Estudios en humanos

Hace varias décadas era frecuente la intoxicación aguda por anilina en trabajadores. Los efectos se atribuyen a la formación de Met-Hb. Las víctimas sufrían de cianosis y síntomas más graves cuanto mayor era la exposición (ECB, 2004).

De acuerdo con observaciones anteriores, 400-600 mg/m³ pueden tolerarse sin causar daños durante una hora, mientras que varias horas de exposición a 100-250 mg/m³ producen síntomas leves. (ECB, 2004).

La ingesta oral de 60 ml de anilina produjo la muerte en cuatro días. La patología reveló cambios degenerativos en el miocardio, hígado y riñón, edema pulmonar y edema y hemorragias en el cerebro. Los casos graves aunque no fatales mostraron una marcada metahe-moglobinemia con cianosis profunda, cefalea, colapso vascular, coma, shock y convulsiones generalizadas (ECB 2004).

La relación dosis-respuesta entre la ingesta oral de anilina y la formación de Met-Hb se estudió con 20 voluntarios que recibieron una dosis de 5, 15 o 25 mg/día, durante tres días consecutivos. Algunos recibieron dosis más altas en días posteriores. Todos los voluntarios estaban sanos (SCOEL, 2015). El aumento medio máximo en la formación de Met-Hb ocurría en menos de 4 horas. Después de la ingesta de 5 mg y 15 mg, el aumento de Met-Hb no fue significativo (1,2% o 1,8%, respectivamente). Se observaron aumentos significativos a 25 mg (2,5% de Met-Hb). Las dosis de 35, 45 y 55 mg condujeron a aumentos de Met-Hb máximos de 3,7% (n = 5), 7,1% (n = 5) y 5,2% (n = 2), respectivamente. Con la dosis más alta de 65 mg se alcanzó un nivel de Met-Hb del 16% en el único voluntario expuesto a esta dosis. No se detectaron cuerpos de Heinz con ninguna dosis. Con

respecto a la formación de Met-Hb, los seres humanos parecen mucho más sensibles que las ratas a las que también se administró anilina por vía oral en el mismo estudio.

Estudios en animales

Vía digestiva

En estudios realizados con ratas se obtuvieron DL_{50} de 442 a 930 mg/kg de peso corporal (ECB, 2004).

La formación de Met-Hb después de la administración oral de anilina (mediante sonda) en ratas macho se comparó con la respuesta en humanos. La administración de 20, 40, 300 y 1.000 mg/kg de peso corporal a ratas, aumentó el nivel de Met-Hb el 3,3%, 12,3%, 18,1% y 48%, respectivamente (SCOEL, 2015).

Se comparó la formación de Met-Hb después de la inhalación y la administración oral en dos grupos de 4 perros Beagle (Pauluhn, 2002) Estuvieron expuestos a 40 y 45 ppm durante 4 h (aproximadamente 14,6 mg/kg de peso). Tras la exposición por vía inhalatoria, 3 de ellos no presentaron signos y 4 una ligera cianosis transitoria. Sí se observaron diferencias marcadas en el nivel de Met-Hb después de la exposición a las mismas dosis de anilina por vía oral y por vía inhalatoria (15 mg/kg de peso corporal). El nivel máximo de Met-Hb alcanzado después de la exposición oral fue de 26,4% de media, pero fue aproximadamente 5 veces menor (4,7% Met-Hb de media) después de la exposición por inhalación. La hiperventilación incrementó la absorción por

inhalación de anilina y el nivel de Met-Hb a casi el mismo nivel que se observó después de la exposición oral. Se observaron diferencias similares, aunque menos pronunciadas, cuando se midió la concentración de aductos de albúmina en suero de anilina.

Los gatos, igual que los perros, parecen más sensibles que las ratas.

Inhalación

En ratas expuestas solo por vía inhalatoria se obtuvo una LC_{50} de 839 ppm/4 h. Sin embargo, en ratas expuestas en todo el cuerpo, la LC_{50} fue considerablemente menor, de 478 ppm/4 h, debido a la absorción dérmica e inhalatoria (ECB, 2004).

En un estudio subagudo (Kim y Carlson, 1986), realizado con ratas, a las que se expuso por vía inhalatoria una única vez a 100 ppm de anilina durante hasta 12 horas, los niveles de Met-Hb estimados, aproximadamente, fueron del 10% a las 3 horas, 18% a las 6 horas y 23% a las 8-12 horas.

Se estudió en perros Beagle machos la formación de Met-Hb en función del tiempo y la concentración (Pauluhn, 2005). Se expusieron a cuatro animales por grupo, solo por vía inhalatoria, a concentraciones de 4 a 127 ppm durante hasta 4 horas. Los niveles de Met-Hb estaban en el nivel basal <0,8% a 4 ppm. Hubo un aumento significativo de Met-Hb a 7,8 ppm y a concentraciones más altas después de, al menos, 1 hora de exposición. A 63 ppm, la formación de Met-Hb alcanzó el 10% después de

4 horas. A la misma concentración, 63 ppm, en un perro que hiperventilaba durante la exposición, los niveles fueron mucho más altos, 40% Met-Hb, y en perros expuestos no solo por vía inhalatoria sino también en todo el cuerpo a vapor de anilina, los niveles de Met-Hb fueron del 30%.

Toxicidad subaguda

La toxicidad de la anilina en ratas, independientemente de la vía de administración, se manifiesta principalmente en los efectos sobre los glóbulos rojos y el sistema hematopoyético. Las observaciones características son: cianosis, con niveles más altos de Met-Hb, lesiones eritrocitarias, con formación de cuerpos de Heinz y anemia hemolítica. Los eritrocitos dañados se eliminan principalmente en el bazo. Después de la administración repetida se observa acumulación de hemosiderina en el bazo y, a veces, también en hígado y riñón, congestión del bazo, coloración oscura y aumento del peso del bazo. La esplenitis, la hiperplasia del bazo y la fibrosis son otros signos después de la exposición prolongada a anilina.

En un estudio subagudo realizado con ratas Wistar macho (30/grupo) expuestas solo por vía inhalatoria a 2,4; 8,4; 24,9 y 70,9 ppm durante 6 horas/día, 5 días/semana, 11 días, seguido de un período de observación posterior a la exposición de 2 semanas, hasta el día 28. Los sacrificios se realizaron en los días 0, 4, 11, 14 y 28. No se observó mortalidad durante el estudio. Se ob-

servó cianosis a concentraciones $\geq 24,9$ ppm y no progresó durante el período de exposición. La formación de Met-Hb y la eritrocitotoxicidad asociada fueron los principales signos de toxicidad. Los cambios incluyeron anemia, cuerpos de Heinz, disminución de hemoglobina y hematocrito, reticulocitosis y efectos sobre el bazo (esplenomegalia, acumulación de hemosiderina, aumento de la proliferación de células hematopoyéticas), que fueron significativos a 24,9 y 70,9 ppm. Se obtuvo un NOAEC con respecto a la eritrocitotoxicidad y los efectos asociados de 8 ppm. Sin embargo, hubo un aumento marginal en la hematopoyesis extramedular esplénica a esta concentración, que el autor juzgó como una respuesta homeostática, en lugar de un efecto adverso inequívoco. A 9,2 mg/m³ (2,4 ppm) no se asoció ningún efecto significativo (Pauluhn, 2004).

En otro estudio subagudo, ratas CD macho fueron expuestas por vía inhalatoria a 0, 17, 45 y 87 ppm de vapor de anilina, 6 horas/día, 5 días/semana, durante 2 semanas (SCOEL, 2015). El nivel de Met-Hb fue significativamente elevado a ≥ 45 ppm, pero no a 17 ppm. Este aumento fue acompañado por síntomas clínicos, ya que los animales expuestos a 87 ppm estaban ligeramente cianóticos. La hematotoxicidad con efectos concurrentes del bazo se observó a ≥ 45 ppm. Se obtuvo un LOAEC de 17 ppm para alteraciones histopatológicas esplénicas mínimas.

En otro estudio 15 ratas machos Sprague-Dawley fueron expuestas solo por

vía inhalatoria a concentraciones de 0, 10, 30, 50 o 150 ppm de anilina, durante 8 horas/día, 5 días o 12 horas/día, 4 días. Una semana después del inicio de la exposición, el hematocrito se redujo en, aproximadamente, un 10% a ≥ 30 ppm. Los niveles de Met-Hb aumentaron por encima de los niveles de control al comienzo del segundo día de exposición a 50 y 150 ppm, con una tendencia a acumularse. Se observó un ligero aumento de Met-Hb (5% de Met-Hb) pero no se observó un efecto acumulativo a 30 ppm. El NOAEC determinado fue 10 ppm. (Kim y Carlson, 1986).

En un estudio subagudo, por vía digestiva, sobre el modo de acción de la toxicidad de la anilina, se administró clorhidrato de anilina con la dieta a grupos de 12 ratas F344 macho durante una y cuatro semanas (Mellert *et al.*, 2004). Todos los animales se sacrificaron en el día 28/29. Los niveles de dosis fueron 0, 4, 12 y 41 mg/kg/día de anilina. Se detectaron aductos de hemoglobina en todos los niveles de dosis después de la 1ª y 4ª semana de alimentación con anilina. No se observaron cuerpos de Heinz en los animales de control y esporádicamente a la dosis más baja, pero aumentaron significativamente a ≥ 12 mg/kg/día después de 1 y 4 semanas. Los hallazgos hematológicos a ≥ 12 mg/kg/día indicaron la presencia de anemia. A la dosis más alta, la anemia hemolítica evidente se acompañó con un aumento de la transferrina sérica y la unión del hierro a la sangre, que reflejaba las perturbaciones en el metabolismo del hierro. Además, una leucoci-

tosis de neutrófilos a esta dosis indicó un proceso inflamatorio en el bazo. Con respecto a la patología del bazo, se produjo una congestión vascular mínima del bazo en 2 animales después de 1 semana y en 4 animales después de 4 semanas a 4 mg/kg/día. Además, el peso del bazo aumentó después de 1 y 4 semanas a ≥ 12 mg/kg/día. Los efectos fueron mucho más severos a 41 mg/kg/día e incluyeron periesplenitis con congestión vascular moderada y deposición de hemosiderina en las células del hígado de Kupffer. El LOAEL en este estudio fue de 4 mg/kg/día. Los autores concluyeron que los hallazgos corroboran la afirmación de que las dosis cancerígenas de anilina conducen a efectos tempranos sobre los parámetros hematológicos, reacción inflamatoria en el bazo y perturbaciones en el metabolismo del hierro como resultado de la anemia hemolítica. En consecuencia, la carcinogenicidad de la anilina puede estar relacionada con procesos definibles relacionados con el umbral.

Toxicidad crónica

Estudios en humanos

Se realizó un estudio con trabajadores de una planta productora de difenilamina donde se utilizaba anilina como materia prima y los únicos productos químicos a los que estaban expuestos eran anilina y cloruro de hidrógeno, la concentración de anilina estaba en el rango de 0,34-0,70 ppm. Se produjo un aumento en Met-Hb durante el primer año en el grupo de trabajadores

en comparación con el grupo control; también se describieron disminuciones en los niveles de hemoglobina, recuento de eritrocitos y factores de coagulación. (SCOEL, 2015).

Estudios en animales

En un estudio de carcinogenicidad con ratas (SCOEL, 2015), se observaron efectos hematológicos (reticulocitosis, disminución de los recuentos de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, aumento de la VCM), hemosiderosis y hematopoyesis esplénica a la dosis más baja aplicada de 7 mg/ kg/día (LOAEL).

Genotoxicidad

Estudios en humanos

En cultivos preparados a partir de muestras de sangre periférica de trabajadores expuestos a anilina durante 4-9 años se observó mayor incidencia de aberraciones cromosómicas (fragmentos, deleciones, roturas) en comparación con los controles sanos. No se proporcionaron datos con respecto a la exposición o la coexposición a otros productos químicos. La validez de estos hallazgos es limitada (SCOEL, 2015).

Estudios en animales

Las pruebas de mutagenicidad y genotoxicidad realizadas con anilina son en su mayoría negativas. Los resultados positivos, generalmente, se limitaron a dosis altas con signos claros de toxicidad.

Se observó una inducción de micronúcleos en la médula ósea de ratones y ratas en una serie de estudios, la mayoría

a dosis altas que se sabe que causan una marcada formación de Met-Hb y una toxicidad general aguda. Los resultados positivos se obtuvieron en ratones con inyección intraperitoneal, mientras que los resultados positivos y negativos se describieron en estudios con ratones y ratas después de la administración oral de anilina. Se observó un aumento del número de micronúcleos en sangre periférica en un estudio subcrónico, vía digestiva, en ratones (Bomhard y Herbold 2005).

En un estudio después de la administración oral de anilina, en condiciones que fueron claramente positivas, se observó un ligero aumento en aberraciones cromosómicas en las células de la médula ósea de ratas (ECB, 2004).

Estudios *in vitro*

La anilina en cepas de *Salmonella typhimurium* dio negativo en la prueba de mutación del gen bacteriano estándar. Además, no se observó mutagenicidad en las pruebas con *Escherichia coli* ni en levaduras. (ECB, 2004).

En ensayos con células de mamífero, la anilina no indujo mutaciones en el locus HPRT en células V79 en ausencia de la mezcla S9. En presencia de la mezcla S9, se observó una respuesta mutagénica a altas concentraciones, que excedió la concentración máxima recomendada por las guías de ensayos actuales (Bomhard y Herbold, 2005).

La anilina mostró efectos mutagénicos y clastogénicos en varios ensayos de linfoma de ratón tanto en ausencia como en presencia de un sistema de activa-

ción metabólica exógena. En general, los efectos fueron débiles o limitados a altas concentraciones, niveles de una marcada citotoxicidad (Bomhard y Herbold, 2005).

La anilina indujo un ligero aumento en los intercambios de cromátidas hermanas (SCE) en líneas celulares de hámster chino, en células epiteliales de hígado de rata y en fibroblastos humanos. También se observaron SCE en linfocitos T humanos inducidos por concanavalina A, a partir de cultivos de sangre completa pero no en cultivos de linfocitos puros. Por lo tanto, se concluyó que los eritrocitos contribuyen en la transformación de la anilina en intermedios genotóxicos. Dos metabolitos de anilina, o-aminofenol y N-fenilhidroxilamina, fueron mucho más efectivos para inducir SCE en fibroblastos humanos a 0,1 mM y 0,05 mM, respectivamente, que la anilina a una concentración mucho mayor (10 mM) (ECB 2004).

Se encontraron roturas de cadena de ADN en células de linfoma de ratón en presencia de mezcla S9, pero solo a una concentración excesivamente elevada de anilina (2 g/l). La anilina no indujo la síntesis de ADN no programada (UDS) en cultivos primarios de hepatocitos de rata, ratón, hámster y humano (Bomhard y Herbold, 2005; ECB, 2004).

Carcinogenicidad

Estudios en humanos

En dos estudios de cohortes con 4.622 y 1.223 hombres, trabajadores en la industria británica de colorantes durante

al menos 6 meses, la incidencia de cáncer de vejiga fue más alta de lo esperado en trabajadores que habían estado expuestos a varios productos químicos, incluida anilina, pero no a los conocidos carcinógenos 2-naftilamina y bencidina (SCOEL, 2015).

En un estudio posterior en una planta de caucho industrial, la coexposición a sustancias químicas que incluyen anilina, o-toluidina e hidroquinona se asoció con un aumento significativo del cáncer de vejiga en el grupo de 708 trabajadores que quedaron definitivamente expuestos y en el de 288 que posiblemente estuvieron expuestos (SCOEL, 2015). En general, los trabajadores de todos estos estudios estuvieron expuestos a una serie de sustancias diferentes y el potencial carcinogénico de la anilina no puede evaluarse a partir de estos hallazgos.

Estudios en animales

En un estudio con ratas F344 (50 animales/sexo/grupo y 25 animales/sexo y grupo de control), los animales fueron alimentados con una dosis equivalente de anilina de 0, 174 o 360 mg/kg/día durante 103 semanas seguido de un período sin administración de 5 semanas. La supervivencia no se vio afectada por la ingesta de anilina; el aumento de peso corporal se redujo ligeramente en hembras y machos a dosis altas. No hubo tumores esplénicos en hembras ni en los machos de control. Las incidencias de varios tipos de tumores mesenquimatosos, principalmente del bazo, aumentaron en las hembras y

en los machos: hemangiosarcomas del bazo en 19/50 machos con la dosis baja y en 20/46 con la dosis alta, fibrosarcomas en 3/50 en la dosis baja y 7/46 en la dosis alta. La incidencia combinada de fibrosarcomas y sarcomas del bazo también fue mayor estadísticamente significativa en ratas macho que la incidencia combinada de fibrosarcomas y sarcomas de múltiples órganos en ratas macho. En ratas hembra, el número de animales con fibrosarcomas o sarcomas del bazo solos o múltiples órganos de la cavidad corporal se asoció significativamente con la anilina. Los efectos no neoplásicos observados incluyeron lesiones esplénicas (fibrosis capsular, cambios grasos, hiperplasia, aumento de la eritropoyesis, hemosiderosis) y aumento de la hemosiderosis en el epitelio tubular renal en ambos sexos y en ambos niveles de dosis (ECB 2004). La incidencia del tumor esplénico fue confirmada en un reexamen; también se confirmó que la incidencia tumoral estaba fuertemente correlacionada con la aparición de lesiones esplénicas no neoplásicas. Se concluyó que los sarcomas surgen de áreas fibróticas preexistentes y es probable que la fibrosis esplénica y la hiperplasia presenten lesiones preneoplásicas (SCOEL, 2015).

En otro estudio con ratas F344 machos y hembras (130 animales por sexo y por grupo) recibieron durante 104 semanas en los alimentos dosis de anilina de 0, 7, 22 y 72 mg/kg/día. La supervivencia se redujo en ratas macho a dosis altas. La incidencia de tumores esplénicos en los machos del grupo de dosis alta fue

mucho mayor que en el grupo de control y los otros dos grupos de dosis. La mayoría de estos tumores eran sarcomas en el bazo (21), pero también había hemangiosarcomas (6) y varios tipos de otros sarcomas en bazo (8). En machos y en hembras a dosis altas, la gravedad y frecuencia de la congestión esplénica aumentó y también varios parámetros sanguíneos (hematocrito, concentración de hemoglobina y recuento de eritrocitos) disminuyeron (SCOEL, 2015).

En base a los estudios con ratas en los que se vio que la anilina induce tumores de bazo, SCOEL la ha clasificado como un carcinógeno del Grupo C, con un umbral práctico.

La anilina a las dosis carcinógenas ocasiona efectos tempranos en los parámetros hematológicos, reacciones inflamatorias en el bazo y perturbaciones del metabolismo del hierro como resultado de la anemia hemolítica (Kan et al., 1993, 1995, 1997).

En otro ensayo de toxicidad subcrónica se administró a ratas Sprague-Dawley macho anilina en agua (0,5 mmol/kg/día durante 30 días) (SCOEL, 2015) Esta dosis de anilina condujo a un aumento significativo en el daño del ADN oxidativo esplénico, medido como 8-hidroxi desoxiguanosina en el bazo.

Toxicidad para la reproducción

Estudios en animales

Toxicidad para el desarrollo

El clorhidrato de anilina se evaluó para determinar la teratogenicidad y los

efectos postnatales en ratas F344. A las hembras embarazadas se administró por sonda 0, 7.2, 21.6, 71.8 mg anilina /kg/día durante los días de gestación 7-20 o desde el día 7 hasta el parto. La toxicidad materna se manifestó como una disminución en el aumento de peso estadísticamente significativa a la dosis alta, un aumento dependiente de la dosis en el peso del bazo (significativo en todas las dosis) y en otros signos característicos de la toxicidad de la anilina: aumento de la formación de Met-Hb y disminución del recuento de eritrocitos en las dosis más altas. No se observaron efectos tóxicos ni en el embrión ni en el feto, ni tampoco efectos teratógenos a ninguna dosis. El examen fetal reveló un aumento significativo, pero marginal, en el peso del hígado y un aumento marginal del volumen de eritrocitos (VMC) en el grupo de dosis alta. Hubo un aumento, dependiente de la dosis, pero no significativo, en el número de camadas en el que se produjo una o más muertes postnatales en todos los grupos tratados (3/16, 4/15, 5/16) en comparación con el control (2/15). Después del cese de la exposición a la anilina en el parto, los efectos maternos persistieron al menos durante el período de lactancia. Las crías examinadas después del parto habían aumentado el VCM en el día 0 (a la dosis alta). El día 25 después del parto, se observó una disminución del peso corporal a la dosis alta, aumento del peso del hígado a la dosis baja y media, pero no en la alta. No se observaron signos de toxicidad en las crías en el día 60. No se detec-

taron cambios de comportamiento en varias pruebas (Price *et al.*, 1985).

Las dosis altas de clorhidrato de anilina (≥ 260 mg/kg, inyección única) pueden causar malformaciones cardiovasculares en el feto y paladar hendido en ratas. Los efectos se atribuyen a la hipoxia materna inducida por Met-Hb (SCOEL, 2015).

RECOMENDACIÓN

Para el establecimiento de los VLA de la anilina se han considerado los siguientes efectos tóxicos: carcinogenicidad, formación de metahemoglobina vinculada a efectos tóxicos en el sistema hematopoyético con toxicidad eritrocitaria y los efectos sobre el bazo.

En general, la genotoxicidad de la anilina parece muy baja, no concluyente. Sin embargo, algunos metabolitos de la anilina, cuando se prueban individualmente, son genotóxicos. Las dosis que produjeron genotoxicidad en algunos ensayos fueron muy altas.

Los datos sobre la carcinogenicidad de la anilina en humanos son insuficientes. Experimentalmente, la anilina es carcinogénica en ratas, pero no en ratones. Los tumores se observaron, principalmente, en el bazo de las ratas macho, y la incidencia del tumor fue claramente no lineal (ECB, 2004). Los efectos tóxicos por exposiciones repetidas podrían desempeñar un papel decisivo para el desarrollo de tumores. (Mellert *et al.*, 2004). La esplenotoxicidad crónica está relacionada con la carcinogenicidad

como proceso secundario, después de un aumento de la descomposición de los eritrocitos por la metahemoglobine-mia inducida por la anilina. De ello se deduce que evitar la metahemoglobi-nemia excesiva protegerá contra la car-cinogénesis en el bazo.

El efecto tóxico crítico es la formación de metahemoglobina (Met-Hb), que dependiendo de la concentración pue-de tener efectos graves para la salud.

Los estudios de exposición con ratas establecieron un NOAEC de 9,2 mg/m³ (2,4 ppm) tras la exposición subaguda (Pauluhn, 2004). En general, los datos experimentales en ratas se consideran compatibles con los observados en hu-manos.

En el estudio de toxicidad subaguda por vía oral con ratas, la dosis mínima que producía de forma esporádica cuerpos de Heinz en los eritrocitos y congestión vascular mínima del bazo fue de 4 mg/kg/día (Mellert *et al.*, 2004). En el estudio de carcinogenicidad (SCOEL, 2015) se obtuvo un LOAEL de 7 mg/kg/día con respecto a la toxicidad de los eri-trocitos y los efectos sobre el bazo.

Suponiendo un peso corporal de 70 kg, un volumen respiratorio de 10 m³ du-rante una exposición de ocho horas y un 100% de absorción, una dosis de 4 mg/kg/día corresponde a 28 mg/m³ (7 ppm). La comparación de los efectos en el estudio de alimentación subaguda y crónica no respalda un fuerte aumento de la gravedad de los efectos con una exposición prolongada. Ambos estu-

dios de alimentación oral no incluyeron exposición adicional a través de la piel.

Tomando estos datos, se puede derivar un VLA basado en la protección frente a los efectos no neoplásicos relevantes, incluida la metahemoglo-binemia. Los datos experimentales en ratas apuntan consistentemente a efectos hematotó-xicos iniciales (formación de Met-Hb, asociados con cuerpos de Heinz) y to-xicidad del bazo por encima de las ex-posiciones repetidas por inhalación de 5 ppm de anilina.

Debido a que existen grandes diferen-cias, en cuanto a las cantidades produ-cidas de Met-Hb, entre los estudios con perros y ratas y los estudios en huma-nos, se tuvieron en cuenta los datos dis-ponibles de los datos de humanos para establecer un VLA.

En el estudio experimental de exposi-ción humana realizado por Käfferlein *et al.* (2014) se indica que, después de una exposición de 6 horas a 2 ppm, se alcanzó un nivel de formación de Met-Hb del 1,6%, que no se espera que au-mente después de 8 horas. Este nivel es más de 2 veces inferior al valor críti-co de Met-Hb, de un 5% nivel de Met-Hb obtenido por (Bolt *et al.*, 1985). No se requiere aplicar un factor de incer-tidumbre al valor de 2 ppm de anilina para obtener el VLA-ED[®] que compen-sara la posible variación interindividual humana adicional, ya que excede las variaciones obtenidas en el estudio de Käfferlein *et al.*, 2014).

Debido a la posible importancia de la metahemoglobinemia con respecto

a la carcinogenicidad de la anilina en animales, se recomienda un VLA-EC® de 5 ppm para limitar las exposiciones a corto plazo con un aumento en la formación de Met-Hb. En la formación de Met-Hb intervienen los metabolitos de la anilina: fenilhidroxilamina y aminofenol. La mayor sensibilidad de los humanos en comparación con la de los animales está asociada con la mayor formación de fenilhidroxilamina. Aunque, como la vida media del Met-Hb en humanos es de aproximadamente 3,5 horas, con este valor límite de corta duración no se alcanzaría el valor crítico

de Met-Hb, pero sí se pretende proteger frente a la relevancia que tiene la formación de metahemoglobina en el probable efecto cancerígeno. (SCOEL, 2015).

La absorción dérmica de anilina, tanto en forma de líquido como de vapor, contribuye sustancialmente a la absorción total de anilina (Dutkiewicz, 1961; Korinth *et al.*, 2008). Por lo tanto, se añade la nota "vía dérmica".

A los niveles recomendados no hay dificultades para su análisis.

BIBLIOGRAFÍA

ACGIH (2001). American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Documentation of the TLV's and BEI's. Aniline.

Baranowska-Dutkiewicz, B., 1982. Skin absorption of aniline from aqueous solutions in man. *Toxicol Lett*, 10, 367-372.

Bolt, H.M., Neumann, H.G., Lewalter, J., 1985. Zur Problematik von BAT-Werten für aromatische Amine. *Arbeitsmed Sozialmed Präventivmed*, 20, 1985, 197-201.

Bomhard, E.M., Herbold, B.A., 2005. Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats. *Crit Rev Toxicol*, 35, 783-835.

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Aniline. 1993.

<https://doi.org/10.1002/3527600418>

ECB, European Chemicals Bureau, 2004. European Union Risk Assessment Report: Aniline. 1st Priority List, Vol.50 EUR 21092 EN. European Commission. Joint Research Centre, 2004.

<http://echa.europa.eu/documents/10162/0abd36ad-53de-4b0f-b258-10cf90f90493>

HSE, Health & Safety Executive, 1997. Aniline. Risk Assessment Document. EH72/8. Suffolk, United Kingdom.

Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. NTP 584: Evaluación de la exposición a anilina: control ambiental y biológico.

Käfferlein HU, Broding HC, Bünger J, Jettkant B, Koslitz S, Lehnert M, Marek EM, Blaszkewicz M, Monsé C, Weiß T, Brüning T, 2014. Human exposure to airborne aniline and formation of methemoglobin: a contribution to occupational exposure limits. *Arch Toxicol*, 88, 1419-1426

Khan, M.F., Kaphalia, B.S., Boor, P.J., Ansari, G.A., 1993. Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, 24, 368-374

Khan, M.F., Boor, P.J., Kaphalia, S., Alcock, N.W., Ansari, G.A.S., 1995. Hematopoietic toxicity of linoleic acid anilide: Importance of aniline. *Fundam Appl Toxicol*, 25, 224-232

Khan, M.F., Boor, P.J., Alcock, N.W., Ansari, G.A.S., 1997. Oxidative stress in the splenotoxicity of aniline. *Fundam Appl Toxicol*, 35, 22-30

Kim, Y.C., Carlson, G.P., 1986. The effect of unusual workshift on chemical toxicity. II. Studies on the exposure of rats to aniline. *Fundam Appl Toxicol*, 7, 144-152

Korinth, G., Weiss, T., Penkert, S., Schaller, K.H., Angerer, J., Drexler, H., 2007. Percutaneous absorption of aromatic amines in rubber industry workers: impact of impaired skin and skin barrier creams. *Occup Environ Med* 64, 366-372.

Korinth, G., Schaller, K.H., Bader, M., Bartsch, R., Göen, T., Rossbach, B., Drexler, H., 2012. Comparison of experimentally determined and mathematically predicted percutaneous

penetration rates of chemicals. *Arch Toxicol* 86(3), 423-430

Lewalter, J., Korallus, U., 1985. Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. *Int Arch Occup Environ Health* 56, 179-196.

Mellert, W., Deckardt, K., Gembardt, C., Zwirner-Baier, I., Jäckh, R., van Ravenzwaay, B., 2004. Aniline: early indicators of toxicity in male rats and their relevance to spleen carcinogenicity. *Hum Exper Toxicol*, 23, 379-389

NRC, National Research Council, 2000. Acute exposure guideline levels for selected airborne chemicals. Volume 1. Subcommittee on Acute Exposure Guideline Levels, Committee on Toxicology, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission of Life Sciences. National Research Council. ISBN 0-309-07294-8. National Academy Press, Washington, DC.

<http://www.epa.gov/oppt/aegl/pubs/tsd5.pdf>

Pauluhn, J., 2002. Aniline induced methemoglobinemia in dogs: pitfalls of route to route extrapolations. *Inhal Toxicol*, 14, 959-973

Pauluhn, J., 2004. Subacute inhalation toxicity of aniline in rats: analysis of time dependence and concentration dependence of hematotoxic and splenic effects. *Toxicol Sci*, 81, 198-215.

Pauluhn, J., 2005. Concentration dependence of aniline-induced methemoglobinemia in dogs: a derivation of an acute reference concentration. *Toxicology*, 214, 140-150.

Price, C.J., Tyl, R.W., Marks, T.A., Paschke, L.L., Ledoux, T.A., Reel, J.R., 1985. Teratologic and postnatal evaluation of aniline hydrochloride in the Fischer 344 rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 77, 465-478.

TMR. (2015). Transparency Marked Research. Aniline.

Weiss, T. Angerer, J. (2002). Simultaneous determination of various aroma-

tic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 778: 179-192.

Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. SCOEL/REC/153 Aniline .H.M. Bolt, D. Papameletiou, C. L. Klein Adopted September. 2015.